

UNTERSUCHUNGEN DER ISOENZYM(PGM₁)-UND
SERUMPROTEIN (Gc, Tf, Pi)-POLYMORPHISMEN
MITTELS DER ISOELEKTRISCHEN
FOKUSSIERUNG

Sebastian Weidinger

1982



Digitized by the Internet Archive
in 2026

UNTERSUCHUNGEN DER ISOENZYM (PGM₁) - UND
SERUMPROTEIN (Gc, Tf, Pi) - POLYMORPHISMEN
MITTELS DER ISOELEKTRISCHEN FOKUSSIERUNG

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von

Sebastian Weidinger

aus München

April 1982



1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. F. Schwarzfischer
2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Cleve

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Juni 1982

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A EINLEITUNG	1
1. Allgemeine Betrachtungen	1
2. Aufgabenstellung	2
B MATERIAL und METHODE	3
1. Blutproben	3
1.1. Gewinnung der Erythrozyten	3
1.2. Hämolyse	4
1.2.1. Stromahaltiges Hämolysat	4
1.2.2. Stromafreies Hämolysat	4
1.3. Gewinnung von Humanserum	4
1.4. Behandlung der Serumproben	5
2. Bereitung der Gele	5
2.1. Polyacrylamidgel	5
2.2. Agarosegel	7
3. Probenauftragung	8
4. Analytische Fokussierapparatur	9
5. Prinzip der Elektrofokussierung	9
5.1. Trägermaterial	10
5.2. pH-Gradient	11
5.3. Analytischer Fokussierungsverlauf	12
6. Proteinnachweis	13
6.1. Overlay-Verfahren	13
6.2. Fixierung	15
6.2.1. Direkte Fixation	15
6.2.2. Immunfixation	16
6.3. Färbung	16
6.3.1. Spezifische Proteinfärbung	16
6.3.2. Entfärbelösungen	17
7. Auswertung und Aufbewahrung	18

	Seite
8. Quantitative Proteinbestimmung	18
8.1. Radiale Immundiffusion	18
8.2. Rakenimmunelektrophorese	19
C ENZYM- und SERUMPROTEIN-MERKMALE	20
1. Phosphoglucomutase I (PGM ₁)	20
1.1. Charakterisierung	20
1.2. Darstellungsmethodik	21
1.3. Formalgenetik	22
2. Gruppenspezifische Komponente (Gc)	25
2.1. Charakterisierung	25
2.2. Darstellungsmethodik	27
2.3. Formalgenetik	28
3. Transferrin (Tf)	30
3.1. Charakterisierung	30
3.2. Darstellungsmethodik	32
3.3. Formalgenetik	33
4. Alpha ₁ -Antitrypsin (Pi)	36
4.1. Charakterisierung	36
4.2. Darstellungsmethodik	37
4.3. Humangenetische Aspekte	38
4.4. Klinisch-genetische Aspekte	40
D ERGEBNISSE und DISKUSSION	43
1. PGM ₁ -Subtypisierung	43
1.1. Differenzierung der Subtypen	43
1.2. Populationsgenetische Untersuchungen	48
1.2.1. Phänotypenverteilung und Allelfrequenzen	48
1.2.2. Vergleich populationsgenetischer Daten	51
1.3. Familienuntersuchungen	53
1.4. Anwendung in der Abstammungsbegutachtung	55

	Seite
2. Gc - Subtypisierung	59
2.1. Klassifizierung der Phänotypen	59
2.2. Populationsgenetische Untersuchungen	62
2.2.1. Verteilung der Gc-Phänotypen und Allelfrequenzen	62
2.2.2. Vergleich populationsgenetischer Daten	63
2.3. Familienuntersuchungen	66
2.4. Anwendung in der Paternitätsbegutachtung	69
3. Tf - Subtypisierung	71
3.1. Phänotypen-Differenzierung	71
3.2. Untersuchungen zur Populationsgenetik	77
3.2.1. Phänotypenverteilung und Allelenhäufigkeit	77
3.2.2. Vergleich mit anderen Populationen	79
3.3. Familienuntersuchungen	81
3.4. Anwendung in der forensischen Serologie	83
4. Pi - Subtypisierung	86
4.1. Identifizierung und Differenzierung der Phänotypen	86
4.2. Untersuchungen zur Populationsgenetik	92
4.2.1. Verteilung der Pi-Phänotypen und Allelfrequenzen	92
4.2.2. Populationsgenetischer Vergleich der Allelhäufigkeiten	96
4.3. Familienuntersuchungen	99
4.4. Praktische Anwendungsmöglichkeiten	102
4.4.1. Paternitätsbegutachtung	102
4.4.2. Klinische Medizin	104
5. Schlußbetrachtung	108
 E ZUSAMMENFASSUNG	 111
 F LITERATURVERZEICHNIS	 114
 ANHANG	 135

A EINLEITUNG

1. Allgemeine Betrachtungen

Seit der Entdeckung der ABO-Blutgruppen durch LANDSTEINER (1901) ist eine kaum mehr übersehbare Anzahl von Blutgruppenmerkmalen und Blutgruppensystemen gefunden worden. Etwa ein Drittel aller Genloci des Menschen weisen einen Strukturpolymorphismus auf (HARRIS, 1966; LEWONTIN, 1967). Die Charakterisierung der erblich bedingten Merkmale wie sie bei Blutgruppen, Transplantationsantigenen, zytoplasmatischen Enzymen und Plasmaproteinen vorliegen, gehört zur genetischen Analyse einer Art, einer Population oder eines Individuums. Derartige Untersuchungen sind von besonderem Interesse, weil ein direkter Bezug von Phänotyp und Genotyp besteht.

Das erstrebenswerte Ziel der Erbgangsanalyse ist es, einen bestimmten Phänotyp zu einem Genotyp in Beziehung zu setzen, also Merkmalsunterschiede auf Unterschiede der genetischen Information zurückzuführen. Dieses Ziel ist bislang nicht generell erreichbar, auch ist der Weg in Abhängigkeit vom jeweils untersuchten Merkmal und den angewandten Methoden unterschiedlich.

Eine vielfach verwendete Methode zur Charakterisierung von Peptiden, Enzymen, Plasmaproteinen und anderen ladungstragenden Teilchen stellt die Elektrophorese nach TISELIUS (1937) dar. Dieses physiko-chemische Verfahren hat seit seiner Einführung in der wissenschaftlichen Forschung und Routine zunehmend an Bedeutung gewonnen. Die isoelektrische Fokussierung als eine relativ neue Technik zählt heute zu den leistungsfähigsten Varianten unter den Elektrophoreseverfahren. In Kombination mit immunologischen Methoden kommt diesem analytischen Trennverfahren im interindividuellen Vergleich auf der Ebene der Proteine als primären Genprodukten eine große Bedeutung in biologischen Forschungsbereichen wie z. B. Genetik, Immunologie und Serologie zu. Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit derartigen Untersuchungen.

2. Aufgabenstellung

Mit Hilfe der isoelektrischen Fokussierung in Agarose- und Polyacrylamidgelen sollen aus menschlichen Blutproben erythrozytäre Enzym- und Serumprotein-Merkmale untersucht werden.

Das Ziel meiner Arbeit ist folgendes:

1. die Entwicklung einer technisch einwandfrei reproduzierbaren Methode zur Bestimmung der Untertypen von Phosphoglucomutase I (PGM_1), Gruppenspezifischer Komponente (Gc), Transferrin (Tf) und Alpha₁-Antitrypsin (Pi).
2. die Erforschung des erweiterten genetischen Polymorphismus dieser Merkmalsysteme an Bevölkerungsstichproben aus Süddeutschland.
3. die Berechnung der Subtypenallelhäufigkeit von PGM_1 , Gc, Tf und Pi aus der beobachteten Phänotypenverteilung der Stichprobenuntersuchungen.
4. die Untersuchung der genetisch determinierten Untertypen bei Familien auf die Gesetzmäßigkeit ihrer Vererbung.
5. die Beschreibung von eventuell neuen genetischen Varianten durch Vergleichsuntersuchungen und
6. die Testung dieser erweiterten polymorphen Merkmalsysteme auf ihren Informationswert für die praktische Anwendung in der Paternitätsbegutachtung.

Die erhaltenen Ergebnisse sollen für weitere blutgruppenserologische Untersuchungen hilfreich sein. Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits publiziert (WEIDINGER, 1980; WEIDINGER u. SCHWARZFISCHER, 1980; WEIDINGER et al., 1980, 1980 a und 1981).

B MATERIAL und METHODE

1. Blutproben

Die Blutproben stammen von verwandten und nichtverwandten Personen aus dem süddeutschen Raum. Etwa 5% der untersuchten Personen sind ausländischer Abstammung. In der Regel handelt es sich um gesunde Männer und Mütter mit ehelichen und nichtehelichen Kindern, die im Rahmen der Vaterschaftsbegutachtung blutgruppenserologisch und erbbiologisch untersucht wurden.

Für die blutgruppenserologischen Untersuchungen wird normalerweise Venenblut ohne Zusatz (Nativblut) verwendet. Die Blutentnahme erfolgt gewöhnlich durch Punktion der Armvene oder in Ausnahmefällen durch einen kleinen Stich in die Fingerkuppe. Die Blutmenge, die man für die Untersuchung von über 20 verschiedenen Merkmalsystemen benötigt, beträgt etwa 5-8 ml. Jede Blutuntersuchung wird protokolliert. Die Probe muß den Namen und Vornamen, das Geburtsdatum oder die Code-Nummer des Probanden tragen, um eventuelle Vertauschungen auszuschließen. Es sei bemerkt, daß ein Teil der Blutproben dem Institut für Anthropologie und Humangenetik der Universität München auf dem Postweg zugestellt wurde.

1.1. Gewinnung der Erythrozyten

Die Erythrozyten sollte man möglichst aus frischem Material gewinnen. Bei einer geronnenen Probe wird das Blut mit Hilfe eines Saugröhrchens aufgesaugt und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Um eine reine Suspension von Blutkörperchen zu erhalten, werden die Erythrozyten in physiologischer NaCl-Lösung (0.9%) aufgeschwemmt und 3 Minuten bei 1800 U/min. zentrifugiert. Der Überstand wird mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Dieser Vorgang wird mehrmals wiederholt, bis der Überstand klar und farblos erscheint. Ein Teil der nichtgewaschenen Erythrozytensuspension wird für weitere Untersuchungen bei $+4^{\circ}\text{C}$ im Kühlschrank aufbewahrt.

1.2. Hämolysen

1.2.1. Stromahaltiges Hämolysat

Die gewaschenen Erythrozyten werden vor ihrer Verwendung hämolysiert. Dies geschieht mit einem Ultraschall-Desintegrator (Sonicator W-220 F), in dem die Proben etwa 10 Sekunden lang beschallt werden. Mit der Zerstörung der Zellmembran werden die zytoplasmatischen Enzyme, das Hämoglobin sowie andere Zellbestandteile aus den roten Blutkörperchen freigesetzt. Die Hämolysen wird daran erkannt, daß sich die Deckfarbe der Erythrozyten verliert und die Lösung eine klare, rote Farbe annimmt. Eine Hämolysen wird auch durch bloßes Einfrieren und Auftauen der Erythrozyten bewirkt. Die Hämolysate werden nach ihrer Verwendung für eventuelle Nachuntersuchungen bei -30°C aufbewahrt.

1.2.2. Stromafreies Hämolysat

Ein Teil der gewaschenen Erythrozyten wird mit etwa einem halben Teil destilliertem Wasser versetzt und für 10 Minuten bei $+4^{\circ}\text{C}$ in den Kühlschrank gestellt. Das Gemisch wird mit einem Viertel seiner Menge Tetrachlorkohlenstoff (CCl_4) versetzt, kräftig geschüttelt und für 20 Minuten bei 3000 U/min. zentrifugiert. Das flüssige Hämoglobin über der Stroma- und CCl_4 -Schicht wird abgehebert und mit 5%-iger Mercaptoäthanolösung versetzt (30 $\mu\text{l}/\text{ml}$ Hämolysat). Das stromafreie Hämolysat hält sich im tiefgefrorenen Zustand mehrere Wochen.

1.3. Gewinnung von Humanserum

Das Serum wird aus dem Material der Blutproben gewonnen. Es bildet den Überstand des geronnenen Blutes und unterscheidet sich vom Plasma im wesentlichen durch das Fehlen des Fibrinogens. Der Überstand wird mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgehebert und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Für die serologischen Untersuchungen werden ungefähr 1 ml Humanserum benötigt. Bei nichtgeronnenem Blut (Citratblut, ⁺Heparinblut)

wird die Probe zuerst 3 Minuten bei 1800 U/min. zentrifugiert und dann der Überstand abpipettiert. Das gewonnene Blutplasma wird wie das Serum weiterbehandelt. Die beschrifteten Proben werden für eventuelle Nachuntersuchungen bei -30°C gelagert.

1.4. Behandlung der Serumproben

Die Gruppenspezifische Komponente und das Alpha_1 -Antitrypsin werden normalerweise aus unbehandelten frischen Serumproben elektrophoretisch dargestellt. Für die Subtypisierung der Transferrine hat sich die Behandlung der Proben mit Eisen als zweckmäßig erwiesen. Dazu werden 200 μl frisches Humanserum in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 6 μl 0.01 M $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ versetzt. Die Proben werden vor der isoelektrischen Fokussierung unter mehrmaligem Schütteln etwa 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

2. Bereitung der Gele

2.1. Polyacrylamidgel

Die Herstellung eines Polyacrylamidgels von 1 mm Schichtdicke erfordert eine Polymerisationsküvette. Auf eine 3 mm dicke Glasplatte (265 x 125 mm) wird eine ebenso große 1 mm dünne, fettfreie Glasplatte gelegt. Die Ränder der dünnen Platte umschließt ein 1 mm starker und 6 mm breiter Dichtungsring aus Silikon. Die Küvette wird durch eine zweite 3 mm dicke Glasplatte abgeschlossen und mit Bulldogklammern zusammengehalten.

Zusammensetzung der Polymerisationslösung:

- 4 g Saccharose (Merck 7654)
- 5 ml Acrylamidlösung (28 %) (Serva 10675)
- 5 ml N,N'-Methylenbisacrylamidlösung (2 %) (Serva 29195)
- 1,6 ml Ampholine Trägerampholyte (40%)*
- 10 μl TEMED (Bio-RAD 161-0800)
- 20 ml Aqua. dest.

* Heparinblut ist für die Elektrofokussierung ungeeignet, da Heparin durch Reaktion mit basischen Ampholyten zu einer Verschiebung der Proteinbandenmuster führt.

Für die Elektrofokussierung der verschiedenen Isoenzyme und Serumproteine werden unterschiedliche pH-Gradienten benötigt. Aus Tab. 1 gehen die experimentell ermittelten Volumina gebrauchsfertiger Trägerampholyte (LKB bzw. Serva) für die einzelnen Systeme hervor.

Tab. 1 Zusammensetzung ampholiner Trägerampholyte

Systeme	Ampholine Ampholyte (ml) *				
	pH 4-4,5	4,5-5	4-5	5-6	5-7
PGM ₁	-	-	-	-	1,6
Gc	-	-	1,2	0,4	-
Tf	-	0,8	-	0,8	-
Pi	1,2	-	0,4	-	-

Das Gemisch wird in einem Vakuumkolben gut gerührt und an einer Wasserstrahlpumpe 5 Minuten lang entlüftet. Nach Zugabe von 1 ml 1%-iger Ammoniumpersulfatlösung wird das Polymerisationsgemisch mit einer Injektionsspritze aufgesaugt und luftblasenfrei in die vorbereitete Küvette überführt.

Abb. 1 Einfüllen der Polymerisationslösung



Bei Tageslicht dauert die vollständige Polymerisation etwa 20-30 Minuten.

Das polymerisierte Gel wird bis zur Verwendung mindestens eine Stunde im Kühlschrank bei $+4^{\circ}\text{C}$ vorgekühlt.

Zur Bereitung von Dünnschicht-Polyacrylamidgelen wurden auch 1 mm dünne Glasplatten mit einer 0.2%-igen Silanlösung (Desaga Polyfix 1000) beschichtet. Silanisierte Glasplatten und Polyesterfolien haben den Vorteil, daß sie für Polyacrylamidgele ausgezeichnete Hafteigenschaften bei sämtlichen Visualisierungsschritten bieten (RADOLA, 1980).

Für Routineuntersuchungen empfiehlt sich auch die Verwendung von Gelfertigplatten (LKB PAG-plates), die in verschiedenen pH-Bereichen erhältlich sind.

2.2. Agarosegel

Eine attraktive Alternative zum Polyacrylamidgel wurde erst kürzlich durch die Entwicklung einer speziellen Agarose für die analytische Elektrofokussierung geschaffen. Die Agarose-EF, welche einen extrem niedrigen elektrosmotischen Wert, minimale Siebungseffekte und gute mechanische Festigkeit besitzt, eignet sich u.a. vor allem zur Auftrennung von Enzymen und Plasmaproteinen mit höheren Molekulargewichten ($10^5 - 10^6$ Dalton).

Zur Bestimmung der PGM_1 -Untertypen haben wir Agarosegele mit folgender Zusammensetzung verwendet.

Zusammensetzung des Agarosegels ($260 \times 125 \times 1 \text{ mm}$):

6 g D-Sorbit reinst (Merck 7758)
0,48 g Agarose-EF (LKB 1802-300)
0,9 ml Agarose-EF Ampholyt, pH 3,5-9,5 (LKB 1818-101)
1,1 ml Ampholine Ampholyt, pH 5-7 (LKB 1809-121)
ad Aqua. dest. auf 60 ml

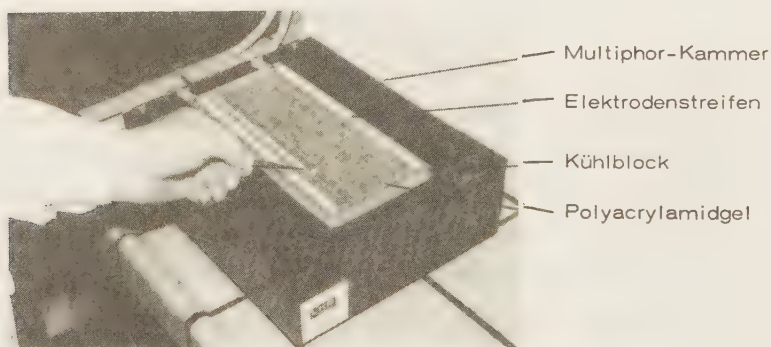
In einem Erlenmeyerkolben wird das D-Sorbit (10%) und die Agarose-EF (0,8%) mit destilliertem Wasser gelöst und im Wasserbad unter ständigem Rühren bis zum Sieden erhitzt. Sobald die Agarose vollkommen gelöst ist, wird das Gemisch etwa eine Minute entgast. Nach Abkühlung auf $+75^{\circ}\text{C}$ werden die Trägerampholyten hinzugegeben. Die heiße Gelmasse wird dann

luftblasenfrei auf eine 1 mm dünne horizontale Glasplatte gegossen und gleichmäßig verteilt. Das Gel wird bis zu seiner Verwendung mindestens zwei Stunden in einer feuchten Kammer bei $+4^{\circ}\text{C}$ vorgekühlt.

3. Probenauftragung

Die Applikation der Proben erfolgt normalerweise mit kleinen Filterpapierstückchen, die man in das Hämolysat bzw. Serum eintaucht und mit einer feinen Pinzette dem Gel auflegt. Bei einem Abstand der Filterplättchen (Größe 4×7 mm) von 1 mm lassen sich etwa 35 Proben nebeneinander auftragen.

Abb. 2 Auftragung von Serumproben



Die Größe der verwendeten Filterplättchen richtet sich nach der quantitativ aufzutragenden Probenmenge. Um optimale Trennergebnisse zu erhalten, sollte man die Auftragsposition für das zu untersuchende Proteinsystem zuerst experimentell ermitteln.

Tab. 2 Auftragsvolumen und Auftragsposition

	Systeme			
	PGM ₁	Gc	Tf	Pi
Filterpapier-Nr. ⁺	3	1	1	1
Auftragsvolumen (μl)	10	5	5	5
Auftragsposition	Anodennähe (3 cm)	Gelmitte		Kathodennähe (2 cm)

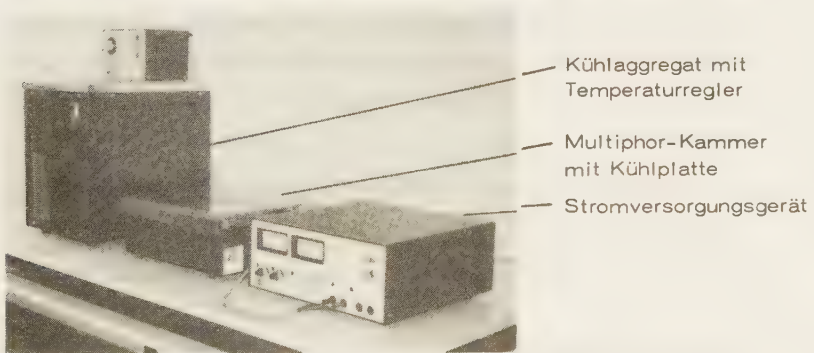
⁺ Whatman (Schleicher & Schüll)

Die Probenapplikation sollte nach Möglichkeit nicht in unmittelbarer Elektrodennähe und auch nicht am isoelektrischen Punkt des aufzutrennenden Proteinsystems erfolgen.

4. Analytische Fokussierapparatur

Für die analytische Fokussierung wird eine Ausrüstung benötigt, die sich im wesentlichen aus einem Stromversorger, einem Kühlaggregat und einer Fokussierkammer mit Kühlplatte zusammensetzt.

Abb. 3 Aufbau der Fokussierapparatur



Zur Elektrofokussierung wird die erforderliche Kühltemperatur mit Hilfe eines Reglers am Kühlaggregat eingestellt. Die Kühlplatte der Multiphor-Kammer (LKB 2117-301) ist über Silikonschläuche an eine Umläufpumpe (18 l/min.) angeschlossen. Ein zweipoliges Anschlußkabel verbindet die Elektrophoresekammer mit einem leistungsstabilen Stromversorgungsgerät (LKB 2103-020), welches eine variable Ausgangsspannung von 0 - 2000V liefert. Aus sicherheitstechnischen Gründen ist die Kammer mit einem Deckel abgeschlossen, durch dessen Abnahme der elektrische Kontakt zum Stromversorger unterbrochen wird.

5. Prinzip der Elektrofokussierung

Die isoelektrische Fokussierung, auch kurz Elektrofokussierung genannt,

ist ein Elektrophoreseverfahren in einem pH-Gradienten. Damit lassen sich ladungstragende Teilchen wie z.B. Peptide, Proteine, Enzyme und Hormone nach ihren unterschiedlichen isoelektrischen Punkten (pI) auftrennen. Als multivalenter Elektrolyt mit ionisierbaren Gruppen wird ein solches Molekül im elektrischen Feld bis zu dem Punkt wandern, an dem der pH-Wert der Umgebung seinem isoelektrischen Punkt entspricht. Dieser pH-Wert wird als pI bezeichnet und ist bei einer Ionenstärke von 0 (Null) eine charakteristische physikalische Konstante für die Trennschubstanz.

Im Gegensatz zu gewöhnlichen Elektrophoreseverfahren mit einem konstanten pH-Wert, weist die Wanderungsstrecke einen pH-Gradienten auf. In einem sehr engen pH-Bereich können selbst Proteine mit unterschiedlichen pI-Werten von weniger als 0.01 pH-Einheiten noch sicher analysiert werden. Die pI-Differenz läßt sich auch mit der folgenden Formel nach RILBE (1976) berechnen:

$$(pI) = 3 \left(\frac{D (dpH / dx)}{E (-du / dpH)} \right)^{1/2}$$

D = Diffusionskoeffizient des Proteins
 E = Feldstärke (V/cm)
 dpH/dx = pH-Gradient
 du/dpH = Richtungskoeffizient des Proteins

Aufgrund der Tatsache, daß die Probenbestandteile im Trennsystem an der Stelle ihres pI-Wertes konzentriert werden, erhielt diese relativ neue Methode den Namen (Iso-) Elektrofokussierung.

5.1. Trägermaterial

Für die analytische Fokussierung werden Gele aus Polyacrylamid und Agarose verwendet. Diese Gele sind im wesentlichen durch die Gelkonzentration (T) und den Vernetzungsgrad (C) charakterisiert.

$$T = \frac{a + b}{m} \times 100$$

$$C = \frac{b}{a + b} \times 100$$

a = Acrylamid (g)
 b = Bis-acrylamid (g)
 m = Totalvolumen der Polymerisationslösung (cm³)

Durch die Größen T und C wird die Porengröße des Polyacrylamidgels festgelegt. 1 mm Dünnschichtgele besitzen bei einer Konzentration $T = 5\%$ und einem Vernetzungsgrad $C = 3\%$ eine hinreichend gute mechanische Stabilität. Sie sind transparent und zeigen keine Siebungseffekte für globuläre Proteine bis zu einem Molekulargewicht von 2×10^5 D. Die rein synthetische Herkunft verhindert, daß ein solches Gel von Enzymen angegriffen wird. Das Polyacrylamidgel ist außerdem gegenüber pH-Einflüssen, Lösungsmitteln und Hitze sehr beständig. Die elektroosmotischen Eigenschaften sind vernachlässigbar klein, da keine geladenen Gruppen vorhanden sind.

Eine Alternative zu diesen Gelen ist Agarose mit extrem niedriger Elektroendosmose ($m_r = 0,005 - 0,01$). Agarose bietet gegenüber Polyacrylamidgelen konventioneller Zusammensetzung den Vorteil enormer Porengröße, einfacher Gelherstellung, ausgezeichneter mechanischer Festigkeit, Nicht-Toxizität und Flexibilität bei Anwendung immunologischer Nachweismethoden. Dieses Trägermaterial ist für die Darstellung von Proteinen mit höheren Molekulargewichten ($10^5 - 10^6$ D) gut geeignet.

5.2. pH-Gradient

Für die Elektrofokussierung ist ein linearer und stabiler pH-Gradient innerhalb der Trennstrecke eine notwendige Voraussetzung. Ein solcher pH-Gradient wird durch Ampholine Trägerampholyten erzeugt, die aus einer Vielzahl niedermolekularer aliphatischer Polyamino-polysäuren ($MG \leq 10^3$ D) mit unterschiedlichen pH-Bereichen (2,5 - 11) bestehen. Sie legen den pH-Wert der umgebenden Lösung fest.

Zum Aufbau eines solchen Gradienten werden dem Trägermedium mindestens 2% Ampholine des gewünschten pH-Bereiches zugesetzt. Der Kontakt der Elektroden zum Trenngel erfolgt über Elektrodenlösungen. Dabei steht die Kathode in Kontakt mit einer stärker basischen und die Anode mit einer stärker sauren Elektrolytlösung als das gewünschte pH-Intervall der Trägerampholyten. Die angelegte Spannung verursacht eine Wanderung der geladenen Ampholyte zur Elektrode mit umgekehrter Polarität. Extreme pH-Werte an der

Anode und Kathode verhindern, daß diese über die Trennstrecke hinaus wandern. Die vollständige Ausbildung des pH-Gradienten, dessen Aufbau von den Elektroden zur Gelmitte hin erfolgt, benötigt für analytische Trennsysteme ungefähr eine Stunde.

5.3. Analytischer Fokussierungsverlauf

Die Blutproben werden ohne Vorfokussierung untersucht. Nach der Probenaufgabe wird die Gelplatte dem Kühlblock der Multiphor-Kammer aufgesetzt. Am oberen und unteren Gelrand wird jeweils ein Filterkartonstreifen (260 x 6 x 1 mm) im Abstand von 10 cm aufgelegt. Ein Streifen wird dabei mit anodischer, der andere mit kathodischer Elektrolytlösung getränkt. Der elektrische Kontakt zum Trenngel wird durch einen abschließenden Elektrodendeckel hergestellt.

Durch Anlegen einer Gleichspannung kommt es zur Wanderung der geladenen Teilchen im elektrischen Feld. Da die meisten Trägerampholyten und Probenbestandteile eine positive oder negative Ladung tragen, ist zu Beginn der Elektrofokussierung die Stromstärke noch relativ hoch. Dadurch, daß die Stromstärke mit zunehmender Fokussierdauer fällt, die Spannung aber möglichst hoch sein sollte, können mit einer konstanten elektrischen Leistung optimale Strom- und Spannungswerte erzielt werden. Die Leistung sollte demnach so gewählt werden, daß nur in Abhängigkeit von der Geltemperatur, eine möglichst hohe Auflösung bei relativ kurzer Analysenzeit erreicht wird. Eine anfänglich zu hohe Stromstärke könnte eventuell zur Überhitzung des Dünnschichtgels und damit zur Zerstörung der zu analysierenden Proteinkomponenten führen. Das Ende der Fokussierung wird durch die nicht weitersinkende Stromstärke angezeigt.

Die folgende Tabelle gibt eine Zusammenfassung über die wichtigsten Daten bei Anwendung der isoelektrischen Fokussierung in Polyacrylamidgelen.

Tab. 2 Fokussierdaten und Elektrolytlösungen für Polyacrylamidgele

	Systeme			
	PGM ₁	Gc	Tf	Pi
pH - Bereich	5 - 7	4 - 6	4 - 6	4 - 5
Leistung (W) max	30	20	25	25
Stromstärke (mA) max	40	35	40	40
Spannung (V) max	1300	1400	1500	1600
Fokussierdauer (min)		180		
Kühltemperatur (°C)		10		
Abnahme der Filter - plättchen nach (min)		90		
Anodenlösung	/— 0,025 M Glu + 0,025 M Asp —/			
Kathodenlösung	/— 0,1 M β -Ala —// 0,5 M Gly —/			

Für die PGM₁-Darstellung mittels der Agarosegel-Isoelektrofokussierung dient als Anodenlösung 0,5 M Essigsäure und als Kathodenlösung 0,5 M NaOH-Lösung. Bei einer Kühltemperatur von +6 °C und Maximalwerten von 20 W, 35 mA und 1100 V dauert die Fokussierung 90 Minuten.

6. Proteinnachweis

6.1. Overlay-Verfahren

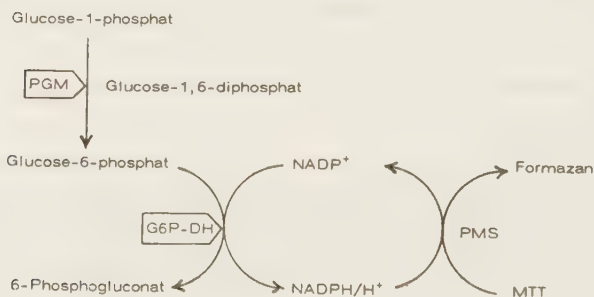
Mit Hilfe der Agargel-Overlay-Technik lassen sich Enzyme durch selektive Farbreaktionen nachweisen. Dazu wird in einer geeigneten Pufferlösung das Enzym-spezifische Reaktionsgemisch bereitet und nach Beendigung der Elektrofofokussierung auf die Geloberfläche aufgetragen. Für den PGM₁-Nachweis werden die folgenden Reagenzien verwendet (modifiziert nach SPENCER et al., 1964).

Zusammensetzung des Reaktionsgemisches:

- 20 ml Tris/HCl/MgCl₂-Pufferlösung (0.1 M), pH 7,8
- 80 mg Glucose-1-phosphat (Boehringer 105 236)
- 1,5 mg Glucose-1.6-diphosphat (Boehringer 127 612)
- 8 mg NADP (Boehringer 128 058)
- 6 mg MTT (Dimethylthiazolyl-diphenyltetrazoliumbromid)
(Serva 20395)
- 6 mg PMS (Phenazinmethosulfat) (Serva 32030)
- 25 µl G6P-DH (Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase)
(5 mg/ml Boehringer 127 663)

In einem Erlenmeyerkolben werden zunächst 300 mg Agar purum (Behringwerke) in 30 ml Pufferlösung, pH 7.8, bis zum Sieden erhitzt. Nach Abkühlung auf + 47 °C wird das Reaktionsgemisch unter leichtem Schütteln hinzugegeben und vorsichtig auf die Gelregion gegossen, wo die PGM₁-Isoenzyme lokalisiert sind. Das Gel wird in eine Färbeschale überführt und dann im Brutschrank für 20 Minuten bei + 37 °C inkubiert.

Farbreaktionsschema:



Phosphoglucomutasen katalysieren in Gegenwart von Glucose-1.6-diphosphat und Mg²⁺ die reversible Umwandlung von Glucose-1-phosphat in Glucose-6-phosphat. Glucose-6-phosphat wird durch das hinzugegebene Enzym Glucose-

6-phosphat-Dehydrogenase zu 6-Phosphogluconat umgesetzt. Damit wird gleichzeitig das Coenzym NADP^+ zu NADPH/H^+ reduziert. Bei dieser gekoppelten Enzym-Farbreaktion entstehen dann an Stellen der PGM_1 -Aktivität blaue Bandenmuster, weil das gelbe Tetrazoliumsalz (MTT) in Gegenwart von PMS zu Formazan reduziert wird.

6.2. Fixierung

6.2.1. Direkte Fixation

Proteine können durch Fixierung unlöslich gemacht werden. Dies geschieht am besten unmittelbar nach der isoelektrischen Fokussierung durch Immersion der Gele in eine der folgenden Fixierlösungen.

Fixierlösung (a)

50 g 5-Sulfosalicylsäure (Dihydrat) (Merck 691)
100 ml Methanol (Merck 6008)
ad Aqua. dest auf 1 l

Fixierlösung (b)

112 g Trichloressigsäure (Merck 822 342)
35 g 5-Sulfosalicylsäure (Dihydrat)
ad Aqua. dest. auf 1 l

Zur vollständigen Proteinfällung läßt man das Dünnschichtgel etwa 30 Minuten im Fixierbad liegen. Dieser Vorgang wird durch leichtes Schütteln beschleunigt. Damit werden zugleich die Trägerampholine von den Proteinen abgetrennt und ausgewaschen. Anschließend wird das Gel mit einem Gemisch aus Äthanol:Essigsäure:Aqua. dest. (25:10:65 v/v) gründlich durchgewaschen, um die Trichloressigsäure und Sulfosalicylsäure vollständig zu entfernen. Betrachtet man nach der Fixierung die Gelplatte in hellem Seitenlicht gegen einen dunklen Hintergrund, so können die Poteinbanden direkt als Trübungen erkannt werden.

6.2.2. Immunfixation

Für den Nachweis von quantitativ geringeren Proteinmengen im Plasma ist eine empfindliche Methode erforderlich. Die Immunfixation ist eine verfeinerte biochemische Methode, mit der sich elektrophoretisch aufgetrennte Genprodukte durch Reaktion mit spezifischen Antikörpern nachweisen lassen. Man spricht von einer Antigen-Antikörper Reaktion, wenn es zur immunologischen Verbindung des Antigens mit seinem korrespondierenden Antikörper kommt. Die Geschwindigkeit dieser Reaktion ist von der Konzentration der Reaktionsteilnehmer, den Eigenschaften des Antigens und seines Antikörpers, sowie den physiko-chemischen Bedingungen abhängig, unter denen die Immunreaktion stattfindet.

Zur Klassifizierung der Gruppenspezifischen Komponente, des Transferrins und Alpha₁-Antitrypsins wird seit kurzem die Isoelektrofokussierung in Kombination mit der Immunfixation verwendet. Für den Nachweis dieser Protein-komponenten wird ein Celluloseacetatstreifen (Millipore ESWP 050 FO) mit einem monospezifischen Antiserum getränkt. Der Streifen wird ca. 1 Stunde bei Raumtemperatur getrocknet und unmittelbar nach der Fokussierung auf die Gelregion aufgelegt, wo die Komponenten lokalisiert sind. Nach einer Reaktionszeit von zwei Minuten wird der Streifen entfernt und über Nacht in physiologischer NaCl-Lösung gewässert, um den Antikörper und das nichtfixierte Protein auszuwaschen. Der Fixierstreifen wird schließlich mit einem Proteinfarbstoff gefärbt.

6.3. Färbung

6.3.1. Spezifische Proteinfärbung

Die aufgetrennten Proteine werden nach der direkten Fixation und Immunfixation durch eine Färbung sichtbar gemacht. Für den Nachweis der Serumproteine (Gc, Tf, Pi) wird Coomassie Brilliant Blau R 250 (Serva Blau R) oder Serva Violett 49 als Farbstoff verwendet. Diese Triphenylmethanfarbstoffe besitzen eine hohe Spezifität und Affinität zu den genannten Proteinen. Sie zeichnen sich durch kurze Färbe- und Entfärbezeiten aus.

Zusammensetzung der Färbelösung

1. für das Gel:

- 50 ml Äthanol (Merck 8052)
- 16 ml Essigsäure 100% (Merck 63)
- 134 ml Aqua. dest.
- 0,2 g Coomassie Brilliant Blau R 250 (Serva 17525)

2. für den Fixierstreifen:

- 100 ml Entfärbelösung des Gels
- 0,1 g Coomassie Brilliant Blau R 250

Bei Färbung mit Serva Violett 49 sollte man die doppelte Menge an Farbstoff verwenden.

Das Gel wird nach der Fixierung für etwa 30 Minuten in die auf + 50 °C erwärmte Färbelösung gebracht. Den Fixierstreifen legt man ebenfalls 30 Minuten in die nichterwärmte Coomassielösung.

6.3.2. Entfärbelösungen

Um den nicht proteingebundenen Farbstoff zu entfernen, legt man das Gel und den Fixierstreifen in die entsprechenden Entfärbelösungen.

Zusammensetzung der Entfärbelösung

1. für das Gel:

- 50 ml Äthanol
- 16 ml Essigsäure 100%
- 134 ml Aqua. dest.

2. für den Fixierstreifen:

- 50 ml Methanol
- 10 ml Essigsäure 100%
- 40 ml Aqua. dest.

Zur Erhaltung eines klaren Gelhintergrundes sollte das Entfärbabad wenigstens zweimal gewechselt werden. Die Entfärbung dauert ungefähr 30 Minuten.

7. Auswertung und Aufbewahrung

Nach der Färbung und Entfärbung werden die Bandenmuster der verschiedenen Proteinsysteme von zwei Beobachtern abgelesen. Zur besseren Unterscheidung der Untertypen wird normalerweise eine Lupe zu Hilfe genommen. In Zweifelsfällen werden die Bandenmuster photometrisch ausgewertet. Mit einem Universal-Densitometer (Vitatron TLD 100) wird bei Durchlicht im Wellenlängenbereich von 578 nm gemessen. Die abgetastete Strecke wird gleichzeitig von einem Kompensationsschreiber (Kontron W+W Recorder 3212) registriert.

Zur Aufbewahrung werden die Polyacrylamidgele 60 Minuten in eine Imprägnierlösung aus Methanol:Wasser:Glycerin (70:26:4) gelegt und anschließend fünf Stunden an der Luft getrocknet. Die Gele werden schließlich mit einer Cellophanfolie abgedeckt und 24 Stunden bei + 45 °C getrocknet. Fixierstreifen lassen sich in 5 %-iger Essigsäure für längere Zeit aufbewahren.

8. Quantitative Bestimmung

8.1. Radiale Immundiffusion

Die quantitative Bestimmung der Serumproteine erfolgt auf NOR-Partigen-Immundiffusionsplatten (Behringwerke), die ein monospezifisches Antiserum gegen diese Proteine in einer gebrauchsfertigen Agarosegelschicht enthalten (MANCINI et al., 1965). In die gestanzten Löcher der Agarosegelplatte werden je 5 µl Humanserum (Verdünnung 1+10) appliziert. Zur Überprüfung der Funktionstüchtigkeit wird in die Auftragstelle 1, in Abhängigkeit vom jeweiligen Protein, 5 µl Kontrollserum in derselben Verdünnung eingetragen. Nach der Probenapplikation läßt man die Platte fest verschlossen für zwei Tage bei Raumtemperatur stehen. Der Durchmesser der Präzipitatringe wird als quantitatives Maß für den Proteingehalt im Serum verwendet.

Das methodische Vorgehen entsprach genau den Angaben des Herstellers, wobei die Sonderangaben hinsichtlich des Meßbereiches berücksichtigt wurden.

8.2. Raketenimmunelektrophorese

Zur Bestimmung des Proteingehaltes im Serum (Plasma) bietet sich als weitere Möglichkeit die Raketenimmunelektrophorese nach LAURELL (1965) an. Dazu wird folgender Puffer verwendet:

(a) Stammlösung

44,3 g Tris (hydroxymethyl)-aminomethan (Merck 8382)
31,0 g 5.5-Diethylbarbitursäure (Merck 500 535)
1,0 g Calciumlactat (Merck 2103)
ad Aqua. dest. auf 1 l

Der pH-Wert wird mit Barbitursäure auf 8.6 genau eingestellt.

(b) Gebrauchslösung : 1 Teil Stammlösung + 4 Teile Aqua. dest.

Agarosegelzusammensetzung (Größe 95x85x1 mm):

0,18 g Agarose-M (LKB 2206-101)
1,8 ml Gebrauchslösung
13,0 ml Aqua. dest.

Das Gemisch wird bis zum Sieden erhitzt und anschließend entgast. Nach Abkühlung auf + 50 °C wird 160 µl spezifisches Antiserum hinzugegeben.

Die Serumproben (5 µl) werden in einer Verdünnung von 1:40 mit einer Mikropipette in die gestanzten Löcher der Agarosegelplatte appliziert. Bei einer Spannung von 80 V und einer Kühltemperatur von + 14 °C beträgt die Laufzeit drei Stunden. Die Platte wird anschließend gewaschen, getrocknet und mit Coomassie Blau gefärbt.

Unter optimalen Verhältnissen bilden die entsprechenden Antigene und Antikörper ein Immunpräzipitat in Form einer Rakete. Für unsere Untersuchungen haben wir anstelle der Präzipitatfläche die Raketenhöhe als quantitatives Maß verwendet.

C ENZYM- und SERUMPROTEIN-MERKMALE

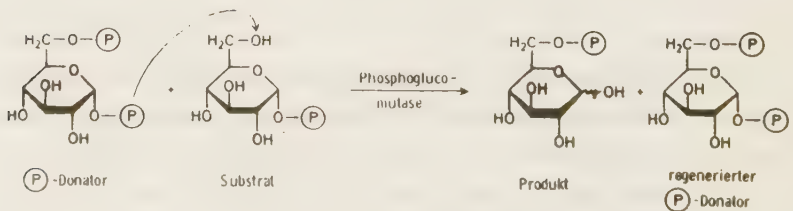
1. Phosphoglucomutase I (PGM₁)

1.1. Charakterisierung

Die Phosphoglucomutasen (EC 2.7.5.1) gehören zur Gruppe der Phosphotransferasen. Sie sind wegen ihrer wichtigen biochemischen Funktion im Kohlenhydratstoffwechsel in tierischen und pflanzlichen Geweben weit verbreitet. Beim Menschen findet man einen relativ hohen Gehalt an PGM₁-Isoenzymen in Leukozyten, Thrombozyten, Fibroblasten, Skelettmuskulatur, Plazenta, Spermien und Erythrozyten (Mc ALPINE et al., 1970). Die Isoenzyme kommen in multimolekularen Formen vor. Sie katalysieren die gleiche Reaktion, unterscheiden sich jedoch in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften. Für erythrozytäre PGM₁-Isoenzyme, die man mittels der Gelfiltration in Sephadex G 200 isolierte, wurde ein Molekulargewicht von 51 000 D bestimmt (Mc ALPINE et al., 1970a). Außer den PGM₁-Isoenzymen kennt man noch die Phosphoglucomutasen PGM₂ und PGM₃.

Die Phosphoglucomutasen katalysieren in Gegenwart von Glucose-1.6-diphosphat und Mg²⁺ die reversible Phosphatübertragung zwischen den Positionen C1 und C6 der Glucose.

Reaktionsschema:



Durch die Enzymreaktion wird aus dem Substrat Glucose-1-phosphat ein Molekül Glucose-1.6-diphosphat neu gebildet. Der verbrauchte organische Cofaktor erscheint als Produkt der Reaktion. Mit der Phosphoglucomutase-

reaktion ist der Anschluß an den Glykolyseweg und Pentosephosphat-Zyklus hergestellt. Ferner steht mit Glucose-6-phosphat eine energiereiche Form der Glucose für die Biosynthese von Glykogen zur Verfügung.

Phosphoglucomutasen können auch die Umwandlung anderer C6- und C5-Zuckermoleküle katalysieren. Der Umsatz von D-Mannose-1-phosphat in D-Mannose-6-phosphat erreicht bei gleichen Reaktionsbedingungen allerdings nur etwa 1/100 der Umsatzrate von Glucose-1-phosphat. Die Phosphoglucomutasen werden auch zur Gruppe der Serin-Enzyme gezählt, weil sie in ihren aktiven Zentren einen essentiellen Serin-Rest besitzen.

Quantitative Bestimmungen ergaben, daß in den verschiedenen menschlichen Geweben die PGM_1 -Isoenzyme dominieren und damit den größten Beitrag zur Gesamtaktivität liefern. Bei Erythrozyten könnten die relativen Isoenzymquantitäten in Beziehung zur Thermostabilität stehen (Mc ALPINE et al., 1970).

Temperaturabhängige Untersuchungen ließen erkennen, daß die PGM_1 -Isoenzyme bei + 60 °C weniger hitzestabil sind als die PGM_2 -Isoenzyme. Am hitzelabelsten erwiesen sich die PGM_3 -Isoenzyme.

1.2. Darstellungsmethodik

Die Analyse von Enzymen mit Hilfe der Gelelektrophorese und spezifischen Nachweismethoden hat eine extensive genetische Variabilität bei den verschiedenen Spezies erwiesen. Untersuchungen mit der konventionellen eindimensionalen Elektrophorese haben beim Menschen und anderen Vertebraten gezeigt, daß wenigstens 25 % der Gene, die Enzymstrukturen determinieren, variabel sind (EDWARDS u. HOPKINSON, 1980).

Zur Typisierung der PGM_1 -Isoenzyme wird neben der herkömmlichen Gelelektrophorese in Stärke, Agarose und Celluloseacetat, in jüngster Zeit die isoelektrische Fokussierung auf Polyacrylamidgelen verwendet. Nach den anfänglichen Versuchen zur Darstellung von Isoenzym-Polymorphismen mittels der Isoelektrofokussierung (ISHIMOTO u. KAWATA, 1972) haben BARK

et al. (1976) für das PGM_1 -System erstmals das genetische Modell von vier Subtypenallelen an einem autosomalen Locus beschrieben. KUEHNLE et al. (1977); SOTTUN u. BURGESS (1978); WELCH et al. (1978) sowie SUTTON (1979) konnten mit einer ähnlichen PAGIF-Methode diese Befunde mit der Beschreibung von 10 häufigen Phänotypen bestätigen. BISSBORT et al. (1978) kamen nach Anwendung der sauren Stärkegelelektrophorese zu einem ähnlichen Ergebnis. Als weitere Methode zur Darstellung der PGM_1 -Untertypen wurde kürzlich die Isoelektrofokussierung auf Agarosegelen beschrieben (WEIDINGER u. SCHWARZFISCHER, 1980).

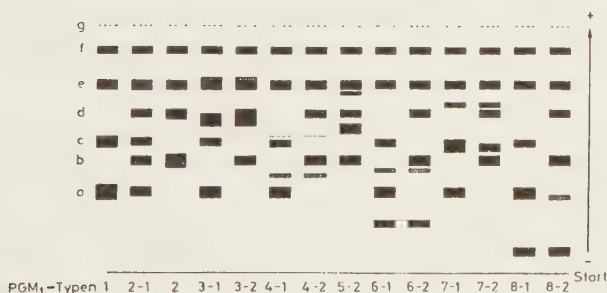
1.3. Formalgenetik

Seit der Entdeckung des genetisch determinierten PGM-Polymorphismus durch SPENCER et al. (1964) wurden drei autosomale Genloci PGM_1 , PGM_2 und PGM_3 identifiziert und den Chromosomen 1, 4 und 6 zugeordnet (SPENCER et al., 1964; NGUYEN et al., 1971; Mc ALPINE et al., 1975; JONGSMA et al., 1973). Die Genorte PGM_1 und PGM_3 sind in der weißen Bevölkerung polymorph.

Mit gewöhnlichen Elektrophoresetechniken lassen sich im PGM_1 -System drei häufige Phänotypen unterscheiden. Die Phänotypen PGM_1^{1-1} , PGM_1^{2-1} und PGM_1^{2-2} werden den Genotypen $\text{PGM}_1^1/\text{PGM}_1^1$, $\text{PGM}_1^1/\text{PGM}_1^2$ und $\text{PGM}_1^2/\text{PGM}_1^2$ zugeordnet. Familienuntersuchungen und Untersuchungen von Mutter-Kind-Verbindungen bestätigten die Existenz von zwei autosomal kodominanten Allelen an einem Genort (SPENCER et al., 1964; HARRIS et al., 1968; RITTNER et al., 1969). Außer den häufigen Allelen PGM_1^1 und PGM_1^2 fand man die seltenen Allele PGM_1^3 , PGM_1^4 , PGM_1^5 , PGM_1^6 , PGM_1^7 und PGM_1^8 . Diese seltenen Allele bedingen Isoenzyme, die sich in ihrer elektrophoretischen Mobilität von den drei häufigen Phänotypen unterscheiden. Sie wurden bislang nur in Kombination mit einem der Standardallele beobachtet (HOPKINSON u. HARRIS, 1965; HARRIS et al., 1968). Besondere Aufmerksamkeit verdient in diesem Zusammenhang ein von FIEDLER u. PETTENKOFER (1968) beschriebener Fall, bei dem keine

PGM₁-Enzymaktivität nachgewiesen werden konnte. Familienuntersuchungen sprechen mit hoher Wahrscheinlichkeit dafür, daß hier ein PGM₁⁰/PGM₁⁰-Genotyp vorliegt. SEGER u. SALMON (1971) sowie WENDT et al. (1971) haben aufgrund von Familienanalysen ebenfalls auf die Existenz eines 'stummen' Allels im PGM₁-System hingewiesen.

Abb. 4 Schematische Darstellung der PGM₁-Phänotypen (nach HARRIS, 1970)



BARK et al. berichteten 1976 erstmals über einen erweiterten PGM₁-Polymorphismus. Mit Hilfe der isoelektrischen Fokussierung ließen sich 10 häufige Phänotypen nachweisen, die vier Allelen am PGM₁-Locus zugeordnet werden konnten. Die PGM₁-Subtypenallele erhielten die vorläufige Bezeichnung PGM₁¹⁺, PGM₁¹⁻, PGM₁²⁺ und PGM₁²⁻.

Untersuchungen mit verschiedenen Methoden ließen erkennen, daß die Summe der Allelfrequenzen von PGM₁¹⁺ und PGM₁¹⁻ sowie von PGM₁²⁺ und PGM₁²⁻ mit den Genfrequenzen PGM₁¹ und PGM₁² übereinstimmt. KUEHNEL u. SPIELMANN (1978), SUTTON u. BURGESS (1978) sowie WELCH et al. (1978) konnten durch Familienuntersuchungen das Erbgangsmodell von vier PGM₁-Subtypenallelen an einem autosomalen Locus bestätigen.

Über die Nomenklatur der PGM₁-Untertypen ist man sich bislang noch uneinig. Tab. 3 zeigt die verschiedenen derzeit existierenden Nomenklaturen für die PGM₁-Subtypenallele.

Tab. 3 Nomenklaturen für PGM₁-Subtypenallele

PGM_1^1	{	PGM_1^{1+}	=	PGM_1^{1S}	=	PGM_1^{a1}	=	PGM_1^{1a}
		PGM_1^{1-}	=	PGM_1^{1F}	=	PGM_1^{a3}	=	PGM_1^{1b}
PGM_1^2	{	PGM_1^{2+}	=	PGM_1^{2S}	=	PGM_1^{a2}	=	PGM_1^{2a}
		PGM_1^{2-}	=	PGM_1^{2F}	=	PGM_1^{a4}	=	PGM_1^{2b}

Zu den biochemischen oder molekularbiologischen Ursachen, die den genetisch bedingten Enzym polymorphismus begründen, gibt es nur wenige Untersuchungen. Nach HOPKINSON u. HARRIS (1966) lassen sich die Ladungsunterschiede der Isoenzyme vermutlich auf einen einfachen Aminosäureaustausch in der Polypeptidkette zurückführen. Die biochemischen Untersuchungen von MEBS (1977) führten zu einem ähnlichen Ergebnis. Danach läßt sich die Entstehung eines zweiten Allels am PGM₁-Locus durch eine Aminosäuresubstitution Valin gegen Glutaminsäure erklären.

Genetische Koppelungsanalysen ergaben, daß zwischen den Loci von PGM₁, Rhesus, Uridin-monophosphat-kinase (UMPK), und den Amylasen AMY₁ und AMY₂ gewisse Assoziationen bestehen (COOK u. HAMERTON, 1979). BERG u. SAUGSTAD (1974) haben auf eine Koppelung zwischen der klassischen Form der Phenylketonurie (PKU 1) und PGM₁ hingewiesen.

Zur Aufklärung der genetischen Konstitution von PGM₁ auf dem Chromosom 1 sind weitere Untersuchungen von Interesse. Bei einem Patienten mit partieller Trisomie [dup(1)(p31.4→p22.1)] wurden kürzlich drei verschiedene Allele (PGM₁¹⁺, PGM₁²⁺ und PGM₁²⁻) an einem Genort gefunden (COUSINEAU et al., 1981).

2. Gruppenspezifische Komponente (Gc)

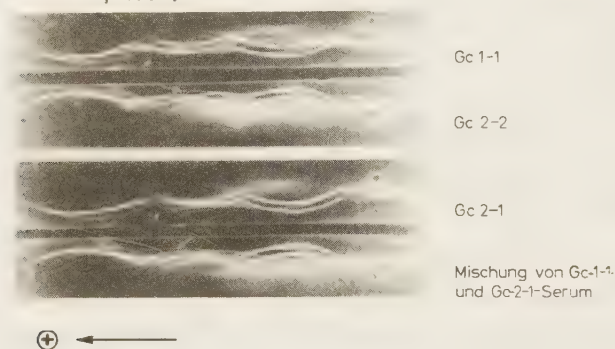
2.1. Charakterisierung

Die Gruppenspezifische Komponente (Gc = Group-specific component) ist ein Serumprotein, das zur Gruppe der α_2 -Fraktion gehört (HIRSCHFELD, 1959). Im menschlichen Plasma besitzt es die Fähigkeit Vitamin D₃ bzw. 25-Hydroxy-vitamin D₃ zu binden und zu transportieren (DAIGER et al., 1975; BOUILLON et al., 1976; CLEVE u. PATUTSCHNICK, 1977). SCHULTZE et al. (1955) analysierten die Gruppenspezifische Komponente als ein 3,7 S-Glykoprotein, das etwa 96 % Proteinanteil und 4 % Kohlenhydratanteil aufweist. Der Kohlenhydratrest setzt sich aus Hexose, Hexosamin, Fucose und N-Acetylneuraminsäure zusammen (CLEVE et al., 1963; SVASTI u. BOWMAN, 1978). CLEVE et al. (1963) haben die Gc-Proteine mittels der Gelfiltration an Sephadex G 100 unter mehrfach wiederholter Rechromatographie isoliert und ein Molekulargewicht von 50 800 D bestimmt. Die quantitative Analyse ergab eine sehr ähnliche Aminosäurezusammensetzung der Proteine des Typs Gc 1-1 und Gc 2-2.

Die Gc-Proteine werden bereits vor der Geburt synthetisiert (CLEVE u. BEARN, 1962). Untersuchungen an Abortmaterial haben gezeigt, daß die Gruppenspezifische Komponente in Seren von 17, 24 und 28 Wochen alten Feten noch fehlte. Erst die Plasmaproben von Feten im Alter von 33 und 36 Wochen ergaben einen positiven Nachweis. Die Untersuchungen verschiedener menschlicher Gewebe in vitro ließen erkennen, daß die Leber wahrscheinlich der einzige Synthesort für die Gc-Proteine ist (PRUNIER et al., 1964). Bei Erwachsenen findet man im Plasma eine durchschnittliche Konzentration von 40 mg/dl (Variationsbreite 20-55 mg/dl).

Die Komponente der α_2 -Globuline besitzt einen genetisch determinierten Polymorphismus (HIRSCHFELD et al., 1960). Mit Hilfe der Immunelektrophorese ließen sich erstmals drei häufige Gc-Typen aufgrund ihrer unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit unterscheiden.

Abb. 5 Gc-Phänotypen nach der Immunelektrophorese (CLEVE und BEARN, 1962)



Der Phänotyp Gc 1-1 ist durch eine elektrophoretisch schneller wandernde Komponente, Gc 2-2 durch eine langsamer wandernde Komponente und Gc 2-1 durch eine schneller und langsamer wandernde Komponente charakterisiert. Auf eine Proteinkomponente mit Gc-Spezifität, die schneller wandert als die Hauptbanden der häufigen Gc-Typen wurde hingewiesen (BEARN et al., 1964).

CONSTANS u. VIAU (1977) konnten mittels der isoelektrischen Fokussierung auf Polyacrylamidgelen und darauffolgender Immunfixation erstmals zwei Subtypen für das Gc¹-Gen nachweisen. Diese Methode ermöglichte die Differenzierung von sechs häufigen Gc-Typen. Biochemisch-genetische Untersuchungen zeigten später, daß zwischen den Gc-Typen mit Einzelbanden- und Doppelbanden-Muster nach Neuraminidasebehandlung ein Unterschied besteht (CLEVE u. PATUTSCHNICK, 1979). Das Doppelbandenmuster beruht auf der Gegenwart von N-Acetylneuraminsäure im anodalen Anteil der Gc-Komponente. Durch die enzymatische Abspaltung verschwindet die anodale Bande, so daß nur noch ein Einzelbandenmuster entsteht. Der kathodale Anteil und die Einzelbanden-Varianten werden durch diese Behandlung nicht verändert.

Die Gc-Merkmale erwiesen sich gegenüber Temperatureinflüssen als bemerkenswert stabil (JOERGENSEN, 1965). Mehrmaliges Einfrieren und

Auftauen über einen Zeitraum von fünf Wochen ergab keine Veränderung am Präzipitattmuster von Humanseren. Die Aufbewahrung mit zerstörten Leukozyten und Thrombozyten ließ allerdings erkennen, daß die Gc-Proteine zu Globulinen mit α_1 -Position transformiert werden können. Proteine des Typs Gc 2-2 werden dabei leichter transformiert als solche des Typs Gc 1-1.

Die Verteilung der Gc-Faktoren wurde bei einer Reihe von Krankheiten untersucht. Diese Untersuchungen zeigten, mit Ausnahme von Lepra, Psoriasis vulgaris und chronische Polyarthritis, keine statistisch signifikanten Abweichungen gegenüber Kontrollgruppen. Für die von der Norm abweichende Verteilung der Gc-Phänotypen ist das untersuchte Material noch zu gering, um eine sichere Aussage zu treffen.

Das phylogenetische Alter des Gc-Polymorphismus läßt sich aufgrund der wenigen Daten, die man von anderen Spezies kennt, nur schätzen. Vermutlich wurden die genetischen Informationen für die Gc-Proteine bereits vor dem phylogenetischen Niveau der Mammalia ausgebildet (REINSKOU, 1968).

2.2. Darstellungsmethodik

HIRSCHFELD entdeckte 1959 mit Hilfe der Immunelektrophorese in Agar (GRABAR u. WILLIAMS, 1953) erstmals einen genetisch bedingten Polymorphismus im Bereich der α_2 -Globuline. Für die häufig vorkommenden individuellen Varianten Gc 1-1, 2-1 und 2-2 prägte er die Bezeichnung 'group-specific component' (Gc-Gruppen). Mit dieser Methode, bei der die aufgetrennten Serumkomponenten mit ihren spezifischen Antikörpern charakteristische Immunpräzipitate bilden, wurden später die seltenen genetischen Varianten Gc X, Y, Ab, Chip, Norway, Z und Eskimo gefunden. Auch mittels der Stärkegel- und Polyacrylamidgel-Elektrophorese ließen sich einige seltene Varianten nachweisen. Die zweidimensionale Antigen-Antikörper-Kreuzimmunelektrophorese in Agarose nach LAURELL (1965) diente zum Nachweis der seltenen Varianten Gc D, W, J, Op und Toulouse. Mit der Agarosegelelektrophorese und darauffolgender Immunfixation nach ALPER u. JOHNSON (1969) sowie JOHNSON et al. (1975) war es möglich alle

bislang bekannten Gc-Typen zu differenzieren. Sie gilt heute noch als Standardmethode zur Klassifizierung der Gc-Proteine. Eine gute Auftrennung in relativ kurzer Zeit läßt sich auch mit der Cellologfolientechnik erreichen (MARTIN u. VOSS, 1977).

Die autoradiographische Darstellung nach DAIGER et al. (1975) sowie CLEVE u. PATUTSCHNICK (1977), bei der die Gc-Proteine nach Markierung mit radioaktivem Vitamin D₃ oder 25-OH-Vitamin D₃ und nachfolgender Gelelektrophorese auf einer photoempfindlichen Schicht sichtbar gemacht werden, brachte einen weiteren Fortschritt. Diese Methode eignet sich gut zum Nachweis von funktionsgestörten Gc-Mutanten. Mit der Isoelektrofokussierung auf Polyacrylamidgelen und darauffolgender Immunfixation konnten erstmals sechs häufige Untertypen im Gc-System nachgewiesen werden (CONSTANS u. VIAU, 1977). Der Nachweis von zahlreichen seltenen Gc-Varianten basiert ebenfalls auf dieser Klassifizierungsmethode. Die Gc-Subtypen ließen sich später auch mittels der Agarosegel-Isoelektrofokussierung differenzieren (THYMAN, 1979).

2.3. Formalgenetik

Das formalgenetische Modell zum Polymorphismus der Gruppenspezifischen Komponente (Gc) wurde erstmals von HIRSCHFELD et al. (1960) beschrieben. Demnach werden drei häufige Phänotypen Gc 1-1, 2-1 und 2-2 von zwei Allelen Gc¹ und Gc² an einem autosomalen Genort bestimmt. Die homozygoten Phänotypen Gc 1-1 und Gc 2-2 wurden durch die Allelkonstellationen Gc¹/Gc¹ und Gc²/Gc², der Phänotyp Gc 2-1 durch Heterozygotie der beiden Allele erklärt. Schon die ersten Familienuntersuchungen durch HIRSCHFELD et al. (1960) haben auf einen autosomal kodominanten Erbgang hingewiesen. Weitere Untersuchungen von Familien und Mutter-Kind-Kombinationen bestätigten die Richtigkeit der genetischen Hypothese (CLEVE u. BEARN, 1963; SCHWARZFISCHER u. ZIEGELMAYER, 1963).

Die ersten genetisch bedingten Varianten Gc X und Gc Y wurden ebenfalls von HIRSCHFELD (1962) beschrieben. Es folgten Gc Aborigine und Gc

Chippewa (CLEVE et al., 1963 a), Gc Norway (REINSKOU, 1965) und Gc Z (HENNIG u. HOPPE, 1965), um nur einige wenige der über 30 verschiedenen Gc-Varianten aufzuzählen. Für die meisten dieser seltenen Gc-Mutanten ließ sich durch Familienuntersuchungen der Erbgang bestätigen.

CONSTANS u. VIAU berichteten 1977 erstmals über einen erweiterten Polymorphismus im Gc-System. Sechs häufige Phänotypen Gc 1S-1S, 1F-1S, 1F-1F, 2-1S, 2-1F und 2-2 ließen sich formalgenetisch durch die Existenz von drei Allelen Gc^{1S} , Gc^{1F} und Gc^2 an einem autosomalen Locus erklären. Populationsgenetische Untersuchungen bestätigten diese Befunde (CONSTANS et al., 1978; CLEVE et al., 1978; OMOTO u. MIYAKE, 1978; KUEHNLE et al., 1978; WEIDINGER et al., 1981). Die Familienuntersuchungen ergaben bislang keine Abweichung vom angenommenen autosomal kodominanten Vererbungsmodus (CONSTANS et al., 1978; CLEVE et al., 1978; WEIDINGER et al., 1981). Auf die Existenz eines 'stummen' Allels Gc^0 (Null) im Gc-System haben PROKOP u. RACKWITZ (1968) sowie MIKKELSEN et al. (1977) hingewiesen.

Über die Beziehung der Gruppenspezifischen Komponente zu anderen Merkmalsystemen wurden Koppelungsanalysen durchgeführt. Nach WEITKAMP et al. (1966), KAARSALO et al. (1967) sowie WEITKAMP (1978) wird eine enge Koppelung zwischen den Genloci für Gc, Albumin und MNSs für wahrscheinlich gehalten. MIKKELSEN et al. (1977) fanden bei einem geistig retardierten Kind eine B-F Chromosomentranslokation. Der Phänotyp Gc 2-2 zeigte dabei eine auffällig niedrige Gc-Konzentration im Serum. Nach der Familienanalyse ergibt sich ein Hinweis für die Lokalisation des Gc-Gens auf dem langen Arm von Chromosom 4.

3. Transferrin (Tf)

3.1. Charakterisierung

Transferrin ist das wesentliche Eisentransportprotein im menschlichen und tierischen Organismus. Es ist ein globuläres Plasmaprotein, das nur humoral vorkommt und keine Speicherfunktion aufweist. Aufgrund seiner physikochemischen Eigenschaften gehört es zur β_1 -Globulinfraktion (SMITHIES, 1957). ROBERTS et al. (1966) bestimmten für das humane Transferrin nach Messung der Sedimentationsgeschwindigkeit und Diffusion ein Molekulargewicht von 75 000 - 80 000 Dalton.

Die Transferrinsynthese beginnt schon in der frühen Phase der menschlichen Entwicklung. Beim Neugeborenen ist bereits eine für den Nachweis ausreichende Menge im Serum vorhanden (SCHEIDEGGER et al., 1956). Der Transferrinanteil am Gesamteiweiß des menschlichen Serums variiert zwischen 3,0 - 6,5 %. Bei einer normalen Plasmakonzentration von 250 mg/dl bei Erwachsenen (Variationsbreite 200-320 mg/dl) können etwa 320 μ g Eisen gebunden werden (BEGEMANN, 1975). GITLIN et al. (1956) ermittelten bei einer Halbwertszeit von 7-10 Tage für das Transferrin eine tägliche Umsatzrate zwischen 12-16 mg/kg Körpergewicht. Es gilt als wahrscheinlich, daß die Leber der wichtigste Syntheseort für dieses metallbindende Protein ist (DANCIS et al., 1957).

Transferrin ist ein Glykoprotein, das zwei aktive Eisenbindungsstellen besitzt. Biochemische Untersuchungen ergaben, daß das Molekül aus einer einzigen Polypeptidkette besteht, wobei zwei identisch doppelverzweigte Kohlenhydratgruppen jeweils an einen Asparaginrest gebunden sein sollen (JAMIESON et al., 1971). Der Kohlenhydratanteil des Moleküls beträgt etwa 6 %. Jede der doppeltverzweigten Kohlenhydratketten endet mit einem Neuraminsäurerest. Bei den verschiedenen Spezies wurde eine variierende Anzahl von Neuraminsäuremolekülen festgestellt (BEZKOROVAINY u. GROHLICH, 1974). Die Sialinsäurereste spielen neben dem Polypeptidanteil eine wesentliche Rolle für die elektrophoretische Mobilität (SCHULTZE

u. SCHWICK, 1957). Mc GILLIVRAY u. BREW (1975) haben durch Sequenzanalysen die schon früher aufgestellte Hypothese über eine Genduplikation und spätere Fusion bewiesen.

Für ein globuläres Protein zeigt das Transferrinmolekül eine ungewöhnlich auffällige Abweichung von der sphärischen Symmetrie. Die Achsen der Ellipsoide von Apo-, Fe_1 - und Fe_2 -Transferrin verhalten sich wie 3:1, 2,5:1 und 2:1 (ROSSENEU-MOTREFF et al., 1971). Durch die Fähigkeit des Moleküls, zwei Eisenatome zu binden, wird die symmetrische Abweichung geringer. Dies ist von biologischer Bedeutung, weil den zwei eisenbindenden Stellen mit ähnlicher Konfiguration im Molekül verschiedene physiologische Eigenschaften zukommen.

Das Plasmatransferrin ist normalerweise nur etwa zu einem Drittel mit Eisen gesättigt. Resorbiertes Eisen wird durch Transferrine zum blutbildenden Gewebe (Knochenmark) oder anderen Depots (z.B. Leber, Herz) transportiert. Die Plazenta läßt die Transferrine passieren. Nach FLETCHER u. HUEHNS (1968) sind die Transferrine auch für die Kontrolle des Eisenstoffwechsels von Bedeutung.

Biochemische Untersuchungen ließen erkennen, daß das Molekül zwei Fe^{3+} -Atome komplex bindet. Für das Transferrin existieren daraus drei molekulare Formen Fe_2 -Tf, Fe_1 -Tf und apo-Tf mit isoelektrischen Punkten von pH 5.3, 5.6 und 5.9 (HOVANESSIAN u. AWDEH, 1976). Das gebundene Eisen wird nach Reduktion zu Fe^{2+} entfernt und mobilisiert. In vivo verläuft dieser Reduktionsvorgang hauptsächlich in Gegenwart von Ascorbinsäure.

Die Eisenbindungsfähigkeit des Transferrinmoleküls ist vom pH-Wert abhängig. Das Molekül ist offensichtlich in der Lage Fe^{3+} -Atome an einer aktiven Bindungsstelle bei etwas niedrigeren pH-Werten zu binden als an der anderen Position (PRINCIOTTO u. ZAPOLSKI, 1975). Die Unterschiede in der Eisenbindung im Bereich von pH 5.0 könnten die Folge einer Konformationsänderung des Proteins sein.

Thermodynamische Untersuchungen von AZARI u. FEENEY (1958) ergaben, daß die Transferrine bei voller Sättigung löslicher und temperaturstabiler sind als ohne Eisen. Nach LAURELL (1947) ist der Transferrin-Fe-Komplex zwischen pH 7.2 und 10.0 am stabilsten.

Die Transferrinvarianten unterscheiden sich sehr wahrscheinlich in ihrer Aminosäurezusammensetzung (WANG et al., 1967). Sie zeigten keine Unterschiede hinsichtlich ihrer Eisenbindungsfähigkeit oder einer signifikanten Resistenzverminderung gegenüber Infektionskrankheiten (TURNBULL u. GIBLETT, 1961; GIBLETT, 1969; KING et al., 1975). Obgleich die Transferrine die Fähigkeit besitzen auch andere Metalle zu binden, hält man es für unwahrscheinlich, daß sie andere Elemente im Organismus transportieren (LAURELL, 1960).

Neben der Transportfunktion hat das Transferrin die Aufgabe, dem Organismus das Eisen zu erhalten und bei verstärktem Angebot eventuell toxisch wirkende Übermengen abzufangen. Bei Immunvorgängen und Infektionen bedarf der Organismus offensichtlich einer bestimmten Eisenmenge im retikulären System (HEILMEYER et al., 1961). Die Transferrine dürften somit auch eine gewisse Rolle als Resistenzfaktoren spielen. Unter bestimmten physiologischen und pathologischen Bedingungen wie z.B. Schwangerschaft, Östrogen- und Cortisol-Verabreichung, akutem Sauerstoffmangel und Eisen-defizit wurde eine Zunahme der Transferrinkonzentration im Plasma festgestellt (GERRITSEN u. WALKER, 1954; MORGAN, 1962; HORNE et al., 1971; JEEJEEBOY et al., 1972). Das völlige oder nahezu völlige Fehlen von Transferrin im Plasma (Atransferrinämie) führt zu einer schweren, hypochrom-mikrozytären, therapieresistenten Anämie (HEILMEYER et al., 1961).

3.2. Darstellungsmethodik

Die Transferrine wurden zuerst von SMITHIES (1955) mit Hilfe der Stärkegelelektrophorese nachgewiesen. Mit dieser Trennmethode, die später vielfach modifiziert wurde, ließen sich drei große Transferringruppen unterscheiden.

Außer den häufig vorkommenden normalen Tf C-Typen kennt man eine Reihe von schneller und langsamer wandernden seltenen Tf-Varianten. Die Tf B-Varianten wandern bei gleichen physiko-chemischen Bedingungen schneller, die Tf D-Varianten hingegen langsamer als die Proteine vom Typ Tf C. Eine ähnliche elektrophoretische Mobilität zeigen die Eisentransportproteine auch nach der Trennung im Agarose- und Polyacrylamidgel bei einem pH-Wert von 8,6. Die aufgetrennten Proteinkomponenten werden nach der Elektrophorese durch Fixierung und Färbung sichtbar gemacht.

KUEHNLE u. SPIELMANN (1978 a) sowie THYMANN (1978) konnten mittels der isoelektrischen Fokussierung auf Polyacrylamidgelen (PAGIF, pH-Bereich 3,5-9,5 bzw. 4-6,5) für die Tf C-Proteine einen erweiterten Polymorphismus nachweisen. Durch Vorbehandlung der Sera mit eisenhaltigen anorganisch-chemischen Verbindungen wurde mit der PAGIF-Methode eine weitergehende Differenzierung der Tf C-Typen erreicht (KUEHNLE u. SPIELMANN, 1979; WEIDINGER et al., 1980; CONSTANS et al., 1980; ALTLAND et al., 1980). Die Transferrinkomponenten lassen sich nach Fixierung und Färbung im Bereich zwischen pH 5,3 und 6,0 identifizieren. In Kombination mit der Immunfixation (Immunoprint-Verfahren) gewährleistet diese Methode eine sichere Differenzierung sämtlicher Tf-Typen (WEIDINGER et al., 1980).

3.3. Formalgenetik

Obwohl die Transferrine schon lange bekannt waren, wurde erst 1957 der genetisch gesteuerte Polymorphismus erkannt (SMITHIES, 1957; HORSFALL u. SMITHIES, 1958). Seit der Entdeckung des Tf-Polymorphismus im Humanserum wurden über 20 verschiedene Varianten in diesem System beschrieben (SMITHIES, 1957; GIBLETT, 1969; WALTER, 1975). In Abb. 6 sind die beobachteten Transferrinvarianten schematisch dargestellt.

Abb. 6 Schematische Darstellung der Transferrinvarianten (WALTER, 1975)



Das Tf^C-Allel ist populationsgenetisch bei den drei großen Rassen am weitesten verbreitet und erreicht bei Europiden mit 0.98-0.99 seine höchste Frequenz. Die vom Tf C-Typ abweichenden genetischen Varianten sind selten. Von den seltenen Varianten kommen Tf B₂, B₁₋₂, B₁ und D₁ in der europäischen Bevölkerung etwas häufiger vor.

Über die genetische Subheterogenität der Transferrine wurde kürzlich berichtet (KUEHNLE u. SPIELMANN, 1978; THYMAN, 1978). Die Untersuchungen mit der isoelektrischen Fokussierung haben gezeigt, daß für den häufigen Tf C-Typ zwei Subtypenallele Tf^{C₁} und Tf^{C₂} existieren, die einem autosomal kodominanten Erbgang folgen. Es ließen sich damit drei häufige Subtypen Tf C₁₋₁, C₂₋₁ und C₂₋₂ unterscheiden. Eine weitere Differenzierung von Tf C₁ in Tf C₁ und C₃ gelang etwas später durch Anwendung einer modifizierten Fokussiertechnik (KUEHNLE u. SPIELMANN, 1979; WEIDINGER et al., 1980; CONSTANS et al., 1980). Damit ließen sich sechs Tf C-Untertypen unterscheiden. Die beobachteten Subtypen Tf C₁₋₁, 2-1, 2-2, 3-1, 3-2 und 3-3 werden wahrscheinlich von drei Allelen Tf^{C₁}, Tf^{C₂} und Tf^{C₃} an einem autosomalen Genort bestimmt. CONSTANS et al. (1980) konnten bei Indianiden und Negriden zwei weitere Subtypen, die sie als Tf C₄ und Tf C₅ bezeichneten, beobachten. Die Existenz weiterer Tf^C-Subtypenallele wird

von den Autoren für wahrscheinlich gehalten.

Der Erbgang der Tf C-Subtypenallele wurde durch Familienuntersuchungen und Untersuchungen von Mutter-Kind-Kombinationen sicher gestellt (KUEHNLE u. SPIELMANN, 1978 a, 1979; WEIDINGER et al., 1980). Alle bisherigen Daten sprechen für einen autosomal kodominanten Erbgang der Transferrine.

Über die chromosomale Zuordnung des Tf-Locus ist man sich bislang noch uneinig. Nach ROBSON et al. (1966) sowie CHAUTARD-FREIRE-MAIA (1977) wird eine Koppelung zwischen dem Tf-Locus und dem Locus der Serum-Cholinesterase (E_1) auf dem Chromosom 1 für wahrscheinlich gehalten.

Über die funktionelle Bedeutung der Tf C-Subtypen für den Eisenstoffwechsel ist noch wenig bekannt. Erste klinische Untersuchungen lassen erkennen, daß Mütter vom Typ Tf C2-2 eine höhere Rate von Spontanaborten aufweisen (BECKMAN et al., 1980).

4. Alpha₁-Antitrypsin (Pi)

4.1. Charakterisierung

Alpha₁-Antitrypsin (α_1 -AT) ist einer der stärksten und wichtigsten extrazellulären Proteaseinhibitoren (Pi) im Plasma. Nach JACOBSSON (1955) liegen etwa 90 % der antitryptischen Aktivität in der Zone der α_1 -Globuline und 10 % in der Zone der α_2 -Globuline. SCHULTZE et al. (1962) haben dieses Plasmaprotein bereits 1955 als ein 3.5 S- α_1 -Glykoprotein isoliert und später aufgrund seiner elektrophoretischen Eigenschaft und der Fähigkeit, Serin-Proteasen zu binden, so bezeichnet. Weitergehende biochemische Untersuchungen zeigten, daß das Molekül aus einer einzigen Polypeptidkette mit einem Kohlenhydratanteil von 12,4 % besteht (HEIMBURGER et al., 1964). α_1 -AT besitzt außerdem eine einzige reaktive SH-Gruppe. Die Aminosäurezusammensetzung weist einen relativ hohen Anteil an Glutaminsäure (12,9%), Asparaginsäure (9,8%) und Leucin (9,9%) auf. Bei der Analyse des Kohlenhydratrestes wurden außer Galactose auch Mannose, Acetylhexosamin, N-Acetylneuraminsäure und Fucose gefunden. SCHOENENBERGER (1955) bestimmte für das humane α_1 -Antitrypsin ein Molekulargewicht von 54 000 D. Nach SCHULTZE u. HEREMANS (1966) sowie KUEPPERS (1972) ist die Leber wahrscheinlich der einzige Synthesort für dieses Protein. Die Halbwertszeit im Serum beträgt etwa 4-6 Tage (KUEPPERS u. FALLAT, 1969; MAKINO u. REED, 1970).

Alpha₁-Antitrypsin gehört zu den Akutphasenproteinen, d.h. es wird im Verlauf von entzündlichen Vorgängen im Körper vermehrt synthetisiert (KOJ, 1974). Die Konzentration im Serum von Erwachsenen beträgt etwa 290 mg/dl (Variationsbreite 200-400 mg/dl). Sie kann sich unter bestimmten physiologischen und pathologischen Bedingungen wie z.B. in der Spätphase der Schwangerschaft oder während einer Infektion, auf etwa das Doppelte erhöhen (GANROT u. BJERRE, 1967; KUEPPERS, 1968). LAURELL et al. (1968) haben darauf hingewiesen, daß orale Kontrazeptiva bei Frauen die α_1 -AT-Konzentration um 30-50 % erhöhen können. Für diesen Effekt sind

wahrscheinlich Östrogene verantwortlich (LIEBERMAN et al., 1971). Ein normaler Ovarialzyklus ist von keiner periodischen Änderung des α_1 -AT-Spiegels begleitet (KUEPPERS et al., 1972).

Die genaue physiologische Funktion von Alpha₁-Antitrypsin ist noch unbekannt. Die Hemmung von proteolytischen Enzymen ist von großer Bedeutung. Trypsin, Chymotrypsin, Elastase und Kollagenase werden beispielsweise von α_1 -AT gebunden und inaktiviert (HEIMBURGER u. HAUPT, 1966; KUEPPERS u. BEARN, 1966; OHLSSON, 1971; JANOFF u. BASCH, 1971). Über die Hemmung von bakteriellen Proteasen wurde ebenfalls berichtet (HEIMBURGER et al., 1971). Diese Untersuchungen zeigten, daß nicht nur die proteolytische sondern auch die esterolytische Aktivität der Enzyme gehemmt wird. RIMON et al. (1966) sowie HECK u. KAPLAN (1974) berichteten von einer Aktivität des Proteaseinhibitors gegenüber Thrombin, Plasmin und Kallikrein. Es wird für wahrscheinlich gehalten, daß α_1 -AT damit auch die Fibrinbildung und das Kininsystem beeinflussen kann. Nach ARORA u. MILLER (1978) soll α_1 -AT auch einen Einfluß auf die Regulation der Immunantwort haben.

4.2. Darstellungsmethodik

Der genetische Polymorphismus des Proteaseinhibitors Alpha₁-Antitrypsin wurde zuerst von FAGERHOL u. BRAEND (1965) mittels der Stärkegelelektrophorese entdeckt. Durch Anwendung der sauren Stärkegelelektrophorese mit darauffolgender Antigen-Antikörper-Kreuzimmunelektrophorese nach LAURELL (1965) ließen sich erstmals deutliche Unterschiede im Elektrophoresemuster von Sera mit niedrigen, intermediären und normalen α_1 -AT-Konzentrationen erkennen (FAGERHOL, 1972). Die Elektrophorese in Agarosegelen (COX u. CELHOFFER, 1974) und in Agarose-Polyacrylamidgelen (LAURELL u. PERSSON, 1973; KLASSEN et al., 1975) wird neben der Immundefixationselektrophorese (JOHNSON, 1976) zur Klassifizierung der Pi-Varianten angewandt.

Die isoelektrische Fokussierung in Polyacrylamidgelen (PAGIF) zeigte deutliche Vorteile gegenüber den herkömmlichen Trennmethoden (ALLEN et al., 1974; ARNAUD et al., 1975; PIERCE et al., 1976). Mittels dieser hochauflösenden Technik, die sich mit immunologischen Methoden kombinieren läßt, konnte man zuerst drei häufige Pi M-Typen M1M1, M1M2 und M2M2 differenzieren (CONSTANS u. VIAU, 1975; KUEPPERS, 1976). Die Mikroheterogenität äußert sich dabei in zwei stärker und drei schwächer ausgeprägten Fraktionen mit isoelektrischen Punkten zwischen pH 4,4 und 4,7. KLASSEN et al. (1977), GENZ et al. (1977), FRANTS u. ERIKSSON (1978), KUEHNEL u. SPIELMANN (1978b) sowie WEIDINGER et al. (1980) entdeckten durch Modifizierung der PAGIF-Methode eine weitere Subheterogenität für die Pi M-Typen. Nach THYMANN (1979) lassen sich die Pi M-Untertypen auch mit der Agarosegel-Isoelektrofokussierung im pH-Bereich von 4-6 klassifizieren. CONSTANS et al. (1980) sowie WEIDINGER (1980) haben nach Anwendung der Elektrofokussierung auf 0,5 mm Polyacrylamid-Dünnschichtgelen auf die Existenz weiterer Pi M-Untertypen im Pi-System hingewiesen.

4.3. Humangenetische Aspekte

Das System des Alpha₁-Antitrypsins (Pi) besitzt einen genetisch gesteuerten Polymorphismus. Seit der Entdeckung durch FAGERHOL u. BRAEND (1965) wurden für dieses System über 30 verschiedene Varianten beschrieben. Das Allel Pi^M kommt populationsgenetisch am häufigsten vor und bedingt normale α_1 -AT-Konzentration im Serum. Populationsgenetische Untersuchungen ließen für das häufige Pi^M-Allel Untertypen erkennen. CONSTANS u. VIAU (1975), KUEPPERS (1976), VAN DEN BROEK et al. (1976) sowie FRANTS u. ERIKSSON (1976) bestätigten durch Familienuntersuchungen das Erbgangsmodell zweier Subtypenallele Pi^{M1} und Pi^{M2}. In weitergehenden Untersuchungen haben KLASSEN et al. (1977), GENZ et al. (1977) sowie FRANTS u. ERIKSSON (1978) auf die Existenz eines dritten Pi^M-Subtypenallels hingewiesen. Danach lassen sich sechs häufige Subtypen Pi M1M1, M1M2, M2M2, M1M3, M2M3 und M3M3 auf die Existenz von

drei Pi^M -Allelen zurückführen. Der angenommene autosomal kodominante Erbgang der Subtypenallele Pi^{M1} , Pi^{M2} und Pi^{M3} ließ sich durch Familienuntersuchungen bestätigen (FRANTS u. ERIKSSON, 1978; KUEPPERS u. CHRISTOPHERSON, 1978; KUEHNL u. SPIELMANN, 1978 b; CLEVE et al., 1979; WEIDINGER et al., 1980). Auf die Existenz eines vierten Pi^M -Subtypenallels haben erst kürzlich CONSTANS et al. (1980) sowie WEIDINGER (1980) hingewiesen. Ein seltenes Allel Pi^O (Null) wurde bei einem Patienten mit nicht mehr nachweisbaren Plasma- α_1 -Antitrypsin gefunden.

Abb. 7 Schematische Darstellung der beobachteten Pi -Phänotypen nach der sauren Stärkegelelektrophorese (A) und der Polyacrylamidgel-Isoelektrofokussierung (B). Die Pi^{M1} -Hauptbanden sind durch Pfeile gekennzeichnet (FAGERHOL u. COX, 1981)

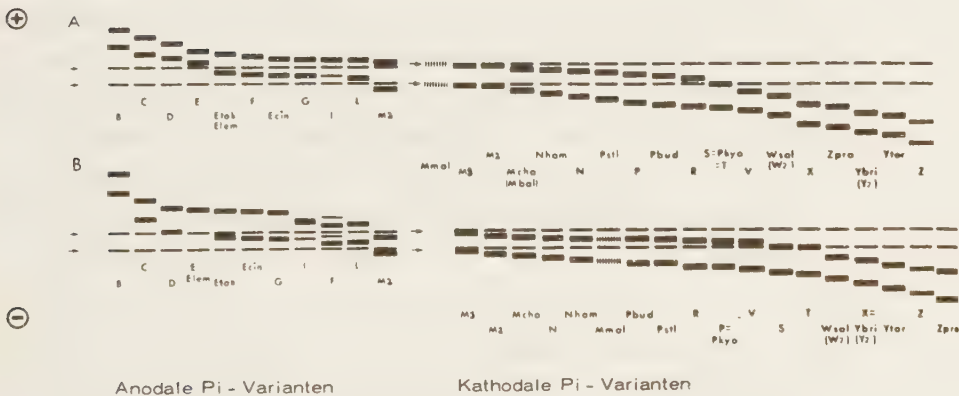


Abb. 7 zeigt die verschiedenen beobachteten Pi -Typen. Nach den Empfehlungen des Internationalen Pi -Komitees (COX et al., 1980) werden die Banden der Pi^M -Typen von der Anode in Richtung Kathode mit M1, M3 und M2 bezeichnet. Im gleichen Sinne gab man den Pi -Varianten die Bezeichnung $B \rightarrow Z$ (anodal = $B \rightarrow L$, kathodal = $N \rightarrow Z$). Einzelne Varianten wurden nach ihrer Herkunft benannt. In der europäischen Bevölkerung sind

die Allele Pi^S und Pi^Z neben den Pi^M -Allelen noch weitesten verbreitet. Eine relativ hohe Pi^S -Allelfrequenz fand man bei Spaniern und Portugiesen, während dasselbe Allel bei Finnen und Lappen fast völlig fehlte (FAGERHOL u. TENFJORD, 1968).

CHAPUIS-CELLIER u. ARNAUD (1979) sowie IAMMARINO et al. (1979) berichteten über einen Befruchtungsvorteil von Pi^Z -tragenden Spermien. Familienuntersuchungen von COX (1980), MITTMAN u. MADISON (1980) sowie BENDER et al. (1981) weisen dagegen auf normale Mendelsche Spaltungen von Pi^Z hin.

Zur Lokalisation des Pi-Strukturgens wurden genetische Koppelungsanalysen durchgeführt. Es interessierte die Frage, ob der Genort in der Nähe eines oder gar mehrerer bekannter Systeme liegt, die sich auf dem gleichen Chromosom befinden. SCHMITT et al. (1975) schlossen damit Teile der Chromosomen 2, 3, 13, 14, 21 und 22 aus. Eine Koppelung zwischen den Loci von Pi und Gm-Marker wird für wahrscheinlich gehalten (GEDDE-DAHL jr. et al. 1972, 1975). HOBART et al. (1981) gelang durch Segregationsanalysen in Somazellhybriden (Mensch-Maus) erst kürzlich die Lokalisation der Gene der schweren Ig G-Kette auf Chromosom 14. Nach den Koppelungsuntersuchungen könnte dieses Chromosom auch als Träger des Pi-Gens in Frage kommen.

4.4. Klinisch - genetische Aspekte

LAURELL u. ERIKSSON (1963) fanden mit der Immunelektrophorese erstmals quantitative interindividuelle Unterschiede von α_1 -AT in Sera von Patienten. Weitergehende klinische Untersuchungen zeigten, daß der Mangel an α_1 -Antitrypsin einem einfachen Mendelschen Erbgang folgt (ERIKSSON, 1964; KUEPPERS et al., 1964). Klinisches Interesse erweckten vor allem die Allele Pi^Z , Pi^P und Pi^S , da sie mit einer verminderten α_1 -AT-Konzentration korrelieren. Bei Pi^ZZ -, Pi^PP - und Pi^SS -Homozygoten fand man beispielsweise nur etwa 15 %, 25 % und 60 % der normalen Plasmakonzentration. Die mittleren Plasma-Normalwerte für Pi^MZ -, MS - und

SZ-Heterozygote betragen hingegen etwa 58 %, 80 % und 38 % der durchschnittlichen α_1 -AT-Konzentration bei Erwachsenen (FAGERHOL, 1969; KUEPPERS, 1971; JEPSSON u. LAURELL, 1975). Die erhobenen Befunde lassen sich wahrscheinlich auf eine additive Wirkung der verschiedenen Allele auf die α_1 -AT-Konzentration zurückführen.

Die biochemische Grundlage über die Assoziation bestimmter Pi-Allele mit den im Plasma verminderten α_1 -AT-Konzentrationen ist noch ungeklärt. Es wird angenommen, daß eine Punktmutation oder eine Änderung in der Struktur des Kohlenhydratanteils zu einer ungünstigen Molekülkonformation führt. Eine verringerte Sekretionsgeschwindigkeit des abnormen Glykoproteins aus dem endoplasmatischen Retikulum der Hepatozyten könnte dann die sekundäre Ursache für eine geringere α_1 -AT-Konzentration sein (SHARP u. FREIER, 1972; YOSHIDA et al., 1976; JEPSSON, 1976).

SHARP et al. (1971) haben darauf hingewiesen, daß bei Pi ZZ-Homozygoten Einschlußkörperchen innerhalb des ribosomenbesetzten endoplasmatischen Retikulums als ein regelmäßig zu beobachtendes Merkmal vorkommen. Elektronenmikroskopische Aufnahmen ließen dabei einen höheren Anteil von Granula (PAS = Para-Aminosalicylsäure) positiven Zellen bei ZZ-Homozygoten als bei MZ-Heterozygoten erkennen (LIEBERMAN et al., 1972; ERIKSSON u. LARSSON, 1975).

Der genetisch bedingte α_1 -AT-Mangel zählt zu den häufigsten angeborenen Stoffwechselkrankheiten in der mittel- und nordeuropäischen Bevölkerung. In Skandinavien entfällt auf 1400 Normalpersonen ein homozygoter Pi Z-Typ, auf 500 Normalpersonen ein Pi SZ-Typ. Nach ERIKSSON (1965), BRISCOE et al. (1966) sowie TALAMO et al. (1968) besteht eine statistisch signifikante Assoziation zwischen Pi ZZ und chronisch obstruktivem Lungemphysem. Die ersten Symptome dieser Krankheit treten in den meisten Fällen während des vierten Lebensjahrzehnts auf. Über eine Prädisposition von MZ-Heterozygoten ist man sich bislang noch uneinig. Auf einen Zusammenhang von Pi ZZ mit anderen Krankheiten wie z.B. Leberzirrhose im Kindes- und Erwachsenenalter (ERIKSSON, 1965; SHARP,

1973) und Hepatom (GANROT et al., 1967) wurde hingewiesen. Außer den Lungen- und Lebererkrankungen gibt es Hinweise, daß Patienten mit Arthritis (COX u. HUBER, 1976), Glomerulonephritis (MOROZ et al., 1976), Pankreatitis (NOVIS et al., 1975) und schweren Immundefizienzerscheinungen (GELFAND et al., 1979) eine höhere Frequenz defizienter Pi-Allele aufweisen. FINEMAN et al. (1976) berichteten schließlich über einen möglichen Zusammenhang zwischen α_1 -AT-Mangel und einer erhöhten chromosomalen Non-disjunction.

D ERGEBNISSE und DISKUSSION

1. PGM₁-Subtypisierung

1.1. Differenzierung der Subtypen

Der PGM₁-Polymorphismus der Erythrozyten wurde mittels der isoelektrischen Fokussierung in Agarosegelen (AGIF) und Polyacrylamidgelen (PAGIF) untersucht. Zur Untersuchung haben wir frische und gealterte HämolySATproben verwendet. Die Proben wurden unmittelbar vor der Elektrofokussierung mit Filterplättchen auf das vorgekühlte Gel in Anodennähe aufgetragen. Eine Vorfokussierung der Gele vor der Probenaufgabe war nicht notwendig.

Abb. 8 PGM₁-Subtypen aus HämolySATen nach 90 min. AGIF (pH 5 - 7)

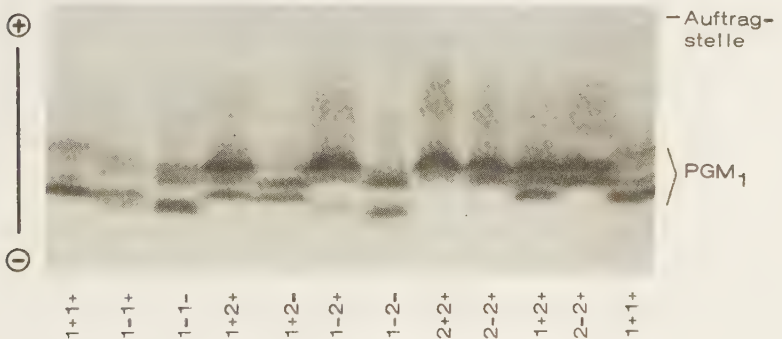


Abb. 8 zeigt neun der zehn häufigen PGM₁-Subtypen wie man sie nach 90 minütiger AGIF beobachten kann. Die Subtypisierung mittels dieser Methode wurde erstmals von WEIDINGER u. SCHWARZFISCHER (1980) beschrieben. Wir bezeichneten die 10 häufigen Phänotypen des erweiterten PGM₁-Polymorphismus nach der von BARK et al. (1976) vorgeschlagenen Nomenklatur als PGM₁ 1+1+, 1+1-, 1-1-, 1+2+, 1+2-, 1-2+, 1-2-, 2+2+, 2+2- und 2-2-. Die verwendete Bezeichnung 1+, 1-, 2+ und 2- weist hierbei auf die anoden- bzw. kathodennähere Position der einzelnen

Subtypen hin. Neben dieser Nomenklatur kennt man für die PGM_1 -Untergruppen noch drei weitere Nomenklaturen (siehe Tab. 3, S.24). Während die von KUEHNEL et al. (1977) gewählte Benennung PGM_1 a1, a2, a3 und a4 die Darstellung der Subtypen in Agarose- und Polyacrylamidgelen verdeutlichen soll, weist die japanische Schreibweise mit PGM_1 1a, 1b, 2a und 2b auf den isoelektrischen Punkt der Isoenzyme (pI 5.8-6.0) im mehr sauren (acid) oder basischen (basic) Bereich hin. In der sauren Stärkegelelektrophorese werden die PGM_1 -Isoenzyme nach ihrer unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit mit S (slow) und F (fast) bezeichnet (BISSBORT et al., 1978).

Abb. 9 PGM_1 -Phänotypen aus Hämolyisaten nach 180 min. PAGIF (pH 5-7)

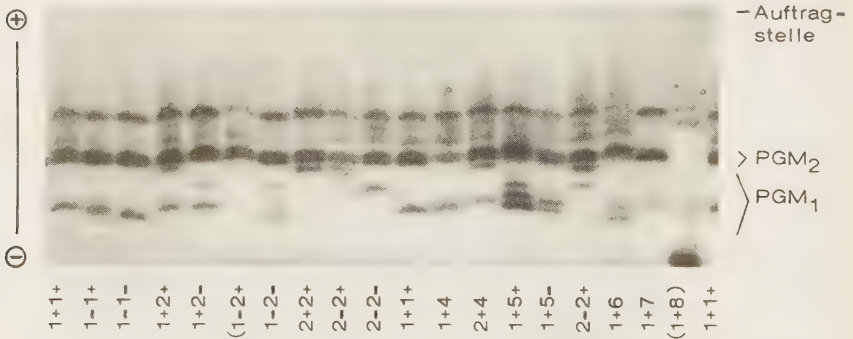


Abb. 10 Vergrößerte schematische Darstellung der beobachteten PGM_1 -Phänotypen nach der PAGIF-Methode

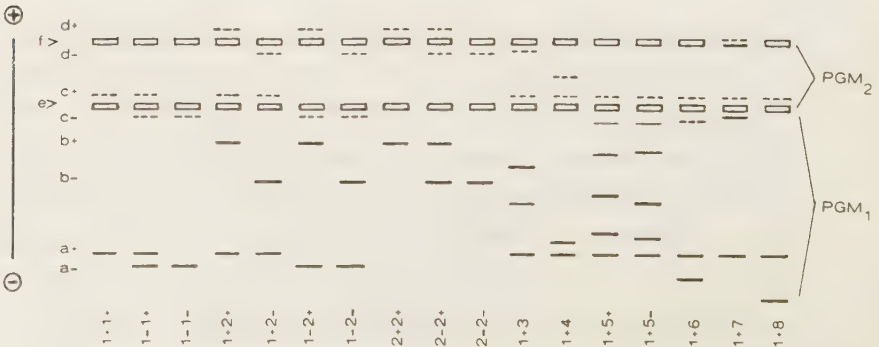


Abb. 9 zeigt neben den 10 häufigen PGM_1 -Subtypen die seltenen Varianten PGM_1 1+4, 2+4, 1+5+, 1+5-, 1+6, 1+7 und 1+8 im heterozygoten Zustand. Zwischen den Bandenmustern der Subtypen ergibt sich nach der isoelektrischen Fokussierung auf Agarose- und Polyacrylamidgelen eine gute Übereinstimmung. Die kürzere Fokussierdauer mit der AGIF wird durch die etwas bessere Auflösung, wie man sie mittels der PAGIF-Methode erhält, ausgeglichen. Mit beiden Darstellungsmethoden ist eine sichere Typisierung der PGM_1 -Untertypen gewährleistet. Bei Paralleluntersuchungen von seltenen PGM_1 -Typen hat sich allerdings eine bessere Differenzierung nach PAGIF ergeben.

In Abb. 10 sind die beobachteten Bandenmuster der PGM_1 - und PGM_2 -Isoenzyme nach PAGIF schematisch dargestellt. Die PGM_1 -Isoenzyme treten wahrscheinlich paarweise auf, d.h. die a+ Isoenzyme sind immer mit c+ und nicht mit c- Isoenzymen gepaart. Das gleiche gilt auch für die a- Isoenzyme, die stets mit c- und nicht mit c+ Isoenzymen vorkommen. Daraus ergibt sich für die primären PGM_1 -Isoenzyme von der Kathode (- Pol) in Richtung Anode (+ Pol) die Reihenfolge a-, a+, b- und b+. Die sekundären Isoenzyme PGM_1 c-, c+, d- und d+ besitzen einen ähnlichen pI-Wert wie die PGM_2 -Isoenzyme. Sie sind nach der PAGIF im Bereich von pH 5,8 von den Doppelbanden e und f des PGM_2 -Systems überlagert und treten deshalb kaum in Erscheinung. Eine Trennung der sekundären PGM_1 -Isoenzyme von den in der weißen Bevölkerung kaum polymorphen PGM_2 -Isoenzymen ist technisch schwer durchführbar.

Für die Klassifizierung der PGM_1 -Untergruppen sind die primären Isoenzymbanden von praktischer Bedeutung. Entsprechend der Kombination a+, a+a- und a- existieren für den normalen homozygoten Phänotyp PGM_1 1-1, der durch die beiden Isoenzyme a und c charakterisiert ist, drei häufige Subtypen, nämlich PGM_1 1+1+, 1+1- und 1-1-. Dasselbe gilt auch für den normalen Phänotyp PGM_1 2-2, der mit den Isoenzymen b und d assoziiert ist. Beim heterozygoten Phänotyp PGM_1 2-1 kommen

danach alle 4 Isoenzyme in verschiedener Kombination vor. Nach der Elektrofokussierung lassen sich die Phänotypen mit einem Einfachbandenmuster ($\text{PGM}_1 1+1+$, $1-1-$, $2+2+$ und $2-2-$) ohne Schwierigkeiten von den übrigen heterozygoten Phänotypen mit Zweifachbandenmuster unterscheiden. Die Heterozygoten zeigen im Unterschied zu der meist stärker ausgeprägten Einzelbande der Homozygoten, allgemein zwei Banden von etwa gleicher Intensität. Dabei erscheinen die Doppelbanden von $\text{PGM}_1 1+1-$ mit einer pH-Differenz von etwa 0,01 unter sämtlichen Heterozygoten am wenigsten weit getrennt.

Abb. 11 Densitogramme der Phänotypen $\text{PGM}_1 1+1-$ und $\text{PGM}_1 1+2+$ nach der Polyacrylamidgel-Isoelektrofokussierung (PAGIF)

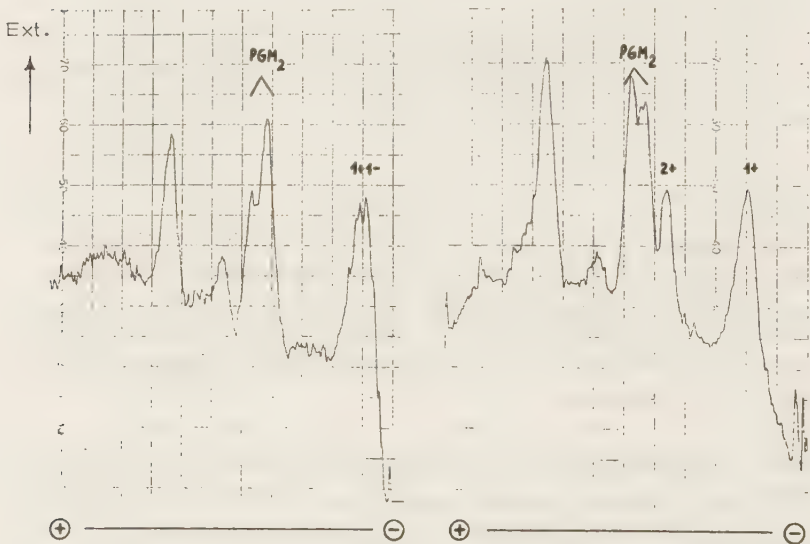


Abb. 11 zeigt die densitometrische Auswertung der PGM-Isoenzymbandenmuster mit Hilfe eines Universal-Densitometers (Vitatron TLD 100). Für die Durchlichtmessung wurde zu einem Lichtspalt von 0,1 mm eine Wellenlänge von 578 nm verwendet. Die Abtastimpulse wurden von einem Kompensationsschreiber (W+W Recorder 3212) registriert. Bei einer Abtastgeschwindigkeit von 1 cm/min. betrug der Papiervorschub 4 cm/min.

Das Trägermaterial selbst diente bei diesem photometrischen Meßverfahren als Null-Punkt.

In Abb. 11 entsprechen die ausgezeichneten Intensitätsverteilungskurven den Bandenmustern von $\text{PGM}_1 1+1-$ und $\text{PGM}_1 1+2+$. Der Subtyp $\text{PGM}_1 1+1-$ zeigt im Densitogramm zwei kathodal eng benachbarte Gipfel von etwa gleicher Intensität, d.h. die optische Dichte der beiden Einzelbanden beträgt jeweils ungefähr 50 Einheiten. Die einzelnen Banden sind für die primären PGM_1 -Isoenzyme $a+$ und $a-$ charakteristisch. Die sekundären Isoenzyme fallen in den Bereich der Doppelbanden von PGM_2 . Eine ebenfalls zweigipfelige Verteilungskurve zeigt der heterozygote Phänotyp $\text{PGM}_1 1+2+$. Dabei entspricht der kathodale 'peak' der Intensität des Isoenzym $a+$ und der anodale 'peak' derjenigen des $b+$ Isoenzym. Nach Integration der Absorptionskurven lassen sich mit Hilfe der Densitometrie sämtliche Bandenmuster quantitativ auswerten und damit eventuell stumme Informationen im PGM_1 -System erfassen.

Im System PGM_1 kennt man neben den 10 häufigen Subtypen eine Reihe von seltenen Mutanten (siehe Abb. 4, S.23). Bei unseren routinemäßigen Untersuchungen konnten wir bislang die seltenen Varianten $\text{PGM}_1 3$, $\text{PGM}_1 4$, $\text{PGM}_1 5$, $\text{PGM}_1 6$ und $\text{PGM}_1 7$ im heterozygoten Zustand beobachten. Diese seltenen Phänotypen sind in den Abb. 9 und 10 dargestellt. Die erst kürzlich gefundene Variante $\text{PGM}_1 3$ besitzt nur eine Einzelbande mit einer Position zwischen $\text{PGM}_1 2+$ und $2-$. $\text{PGM}_1 4$ zeigt eine nur wenig anodal von $\text{PGM}_1 1+$ liegende Bande. Für die genetische Variante $\text{PGM}_1 5$ wurde ein Vierbandenmuster beobachtet, das sich aus zwei kathodal stärkeren und zwei anodal schwächeren Banden zusammensetzt. Die Differenzierung dieser Variante in $\text{PGM}_1 5+$ und $\text{PGM}_1 5-$, die hier erstmals beschrieben wird, war praktisch nur mittels der PAGIF-Methode möglich. $\text{PGM}_1 6$ und $\text{PGM}_1 8$ besitzen jeweils eine kathodenwärts von $\text{PGM}_1 1-1-$ liegende Hauptbande. Die in Abb. 9 dargestellte Variante $\text{PGM}_1 8$ stammt von einem Menschenaffen (Orang Utan). Sie soll angeblich eine ähnliche elektrophoretische Mobilität wie die gleichnamige menschliche Variante aufweisen (persönl. Mitteil. von Herrn Dr. Kömpf, Tübingen). Der seltene Phänotyp $\text{PGM}_1 1+7$ läßt sich auch mit den beiden angewandten Fokussierungs-Methoden nur schwer vom Subtyp $\text{PGM}_1 1+1+$ unterscheiden.

Ein Vergleich mit Standardproben vom Typ PGM_1 1+7 und PGM_1 2-7, die mir Herr Dr. Kömpf freundlicherweise zur Verfügung stellte, zeigte nach mehreren Wiederholungen, daß für die Variante PGM_1 7 die etwas stärkere kathodale Hauptbande im PGM_2 -Bereich charakteristisch ist.

Auf die Existenz eines 'stummen' Allels im System PGM_1 wurde bereits mehrmals hingewiesen (SEGER u. SALMON, 1971). Bei den routinemäßigen Untersuchungen in unserem Labor ergab sich kürzlich in einem Fall ein derartiger Hinweis. Die Probanden, bei denen eine entgegengesetzte Homozygotie festgestellt wurde, zeigten nach der Typisierung auffallend schwächere PGM_1 -Banden. Diese Befunde ließen sich mit der normalen Stärkegelelektrophorese als auch mit der Isoelektrofokussierung durch Wiederholung an frischen Blutproben bestätigen. Nachdem bekanntlich auch gealterte Proben einen gewissen Verlust an enzymatischer Aktivität aufweisen, ist in solchen schwierigen Fällen eine quantitative Bestimmung (z.B. Densitometrie) neben einer Familienuntersuchung unerlässlich. Die Subtypisierung von gealterten Proben (bis etwa 6 Monate) ergab bislang keinen vom Normaltyp abweichenden Phänotyp. Trotz der Feststellung, daß die PGM_1 -Isoenzyme relativ stabil sind, sollten die Untersuchungen nach Möglichkeit an frischem Material vorgenommen werden, um eventuelle Fehltypisierungen zu vermeiden.

1.2. Populationsgenetische Untersuchungen

1.2.1. Phänotypenverteilung und Allelfrequenzen

Um die Häufigkeitsverteilung der PGM_1 -Phänotypen in Süddeutschland festzustellen, wurde ein Kollektiv von insgesamt 1157 nichtverwandten Personen untersucht. Die folgende Tabelle zeigt die Häufigkeit der beobachteten und erwarteten PGM_1 -Phänotypen in absoluten Zahlenwerten und Prozentzahlen.

Tab. 4 Verteilung der PGM₁-Phänotypen und Allelfrequenzen in einer Stichprobe aus Süddeutschland

Phänotypen	Beobachtet		Erwartet		Allel- frequenzen
	n	%	n	%	
PGM ₁ 1+ 1+	448	38.72	453.69	39.21	PGM ₁ ¹⁺ = 0.6262
1+ 1-	186	16.07	184.75	15.97	
1- 1-	18	1.56	18.81	1.63	PGM ₁ ¹⁻ = 0.1275
1+ 2+	299	25.84	289.37	25.01	PGM ₁ ²⁺ = 0.1997
1+ 2-	65	5.62	65.06	5.62	
1- 2+	59	5.10	58.92	5.09	PGM ₁ ²⁻ = 0.0449
1- 2-	14	1.21	13.25	1.15	
					PGM ₁ ^{Var} = 0.0017
2+ 2+	41	3.54	46.14	3.99	
2+ 2-	21	1.82	20.75	1.79	
2- 2-	2	0.17	2.33	0.20	
1+ 5	1	0.35	3.93	0.34	
1+ 6	1				
1+ 7	1				
2+ 4	1				
Summe	1157	100.00	1157.00	100.00	

$$\sum \chi^2 = 1.1012 ; \text{ df } = 6 ; P > 0.20$$

Phänotypen mit Erwartungswerten $n < 10$ wurden zur χ^2 -Berechnung zusammengefaßt.

In unserem Untersuchungsgut wurden außer den 10 häufigen PGM_1 -Untertypen noch 4 seltene genetische Varianten ($\text{PGM}_1 4$, $\text{PGM}_1 5$, $\text{PGM}_1 6$ und $\text{PGM}_1 7$) im heterozygoten Zustand gefunden. Die beobachteten Werte stimmen mit den Erwartungswerten nach dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ($p^2 + 2pq + q^2 = 1$) gut überein. Aus der Häufigkeitsverteilung der Phänotypen ließen sich danach die Allelfrequenzen berechnen.

Tab. 4 zeigt, daß das Subtypenallel PGM_1^{1+} mit einer Frequenz von 0.6262 in dieser Bevölkerungsstichprobe am häufigsten vorkommt. Es folgen dann die Allele PGM_1^{2+} , PGM_1^{1-} und PGM_1^{2-} mit den Frequenzen 0.1997, 0.1275 und 0.0449. Für die seltenen PGM_1 -Varianten beträgt die Allelenhäufigkeit insgesamt 0.0017. Eine Addition der Allelfrequenzen von PGM_1^{1+} und PGM_1^{1-} einerseits sowie PGM_1^{2+} und PGM_1^{2-} andererseits ergab, daß die Summe jeweils recht gut dem bislang bekannten Zweiallelensystem ($\text{PGM}_1^1 = 0.7537$, $\text{PGM}_1^2 = 0.2446$) entspricht. In einem Fall konnten wir die Existenz eines PGM_1^0 (null) -Allels nachweisen. Es zeigte sich eine konträre Homozygotie zwischen 'Vater' und Kind. Über dessen Vorkommen in unserer Population läßt sich gegenwärtig, wegen der noch geringen Anzahl von Untersuchungen, kaum etwas aussagen.

Für unser Untersuchungsgut wurde ein χ^2 -Wert von 1.1012 ermittelt. Dabei haben wir die seltenen PGM_1 -Varianten zur χ^2 -Berechnung zusammengefaßt. Bei 6 Freiheitsgraden (Zahl der getrennt zur χ^2 -Berechnung herangezogenen Phänotypen minus Zahl der Allele) ergibt sich ein P-Wert von >0.20 .

Es sei schließlich darauf hingewiesen, daß die Typisierung mit den beiden Methoden durchgeführt wurde. Die Paralleluntersuchungen führten dabei stets zu demselben Ergebnis, d.h. nach der PAGIF und AGIF ergaben sich für die verschiedenen PGM_1 -Typen übereinstimmende Bandenmuster. Erfahrungsgemäß ist in Zweifelsfällen (gealterte Proben, isolierter Ausschluß, seltene Variante, 'stummes' Allel) eine Typisierung mit beiden Methoden angebracht.

1.2.2. Vergleich populationsgenetischer Daten

Nach der Erstentdeckung des erweiterten PGM_1 -Polymorphismus durch BARK et al. (1976) richtete sich das Interesse auf die Häufigkeitsverteilung der vier Subtypenallele in den verschiedenen ethnischen Gruppen.

Tab. 5 PGM_1 -Subtypenallelfrequenzen bei verschiedenen Populationen

Populationen (Autoren)	n	Allelfrequenzen			
		PGM_1^{1+}	PGM_1^{1-}	PGM_1^{2+}	PGM_1^{2-}
England					
(Bark et al., 1976)	123	0.6341	0.1138	0.1829	0.0692
(Sutton u. Burgess, 1978)	102	0.6180	0.1220	0.1420	0.1180
(Police Forens. Sci. Lab., 1978)	1888	0.6240	0.1340	0.1800	0.0620
Schweden					
(Svensson u. Wetterling, 1979)	2000	0.6100	0.1600	0.1600	0.0700
Schweiz					
(Scherz et al., 1981)	501	0.6278	0.1297	0.1936	0.0489
Südwestfrankreich					
(Vergnes u. Sevin, 1981)					
Toulouse	220	0.6636	0.1046	0.1750	0.0568
Basken	160	0.6094	0.1094	0.2406	0.0406
Barèges	164	0.6500	0.0343	0.3063	0.0094
BRD					
Hessen					
(Kühnl et al., 1977)	291	0.6186	0.1426	0.1718	0.0670
(Kühnl u. Spielmann, 1978)	1678	0.6305	0.1320	0.1844	0.0530
Südwestdeutschland					
(Bissbort et al., 1978)	329	0.6500	0.1230	0.1750	0.0520
West-Berlin					
(Martin, 1979)	620	0.6270	0.1360	0.1890	0.0480
Süddeutschland					
(Weidinger u. Schwarzf., 1980)	470	0.6212	0.1224	0.2043	0.0521
(Eigene Befunde)	1157	0.6262	0.1275	0.1997	0.0449
Japan					
(Matsumoto et al., 1979)	898	0.6974	0.0862	0.1580	0.0540
Neufundland (Weiße)	300	0.5470	0.1500	0.2320	0.0710
Gambia (westafrikan. Neger)	637	0.7950	0.0530	0.1330	0.0190
Indien, Pakistan, Sri Lanka	88	0.5340	0.1020	0.2670	0.0970
(Welch et al., 1978)					

Tab. 5 zeigt die gefundenen PGM_1 -Subtypenallelfrequenzen von verschiedenen europäischen und außereuropäischen Bevölkerungsgruppen. Zur besseren Übersicht wurde eine einheitliche Nomenklatur gewählt. Die seltenen PGM_1 -Varianten (Häufigkeit ≤ 0.002) blieben hier unberücksichtigt.

Die populationsgenetischen Untersuchungen wurden mit verschiedenen Methoden (Polyacrylamidgel-, Agarosegel-Isoelektrofokussierung, Saure Stärkegelelektrophorese) durchgeführt. Als Ausgangsmaterial haben die meisten Autoren Hämolysate verwendet. KUEHNLE et al. (1977 a) haben den erweiterten PGM_1 -Polymorphismus auch an Leukozytenlysaten, Spermalysaten und Plazentaextrakten nachgewiesen. Unabhängig von den verschiedenen Methoden und Ausgangsmaterialien wurden bei den größeren Bevölkerungsstichproben in Mitteleuropa übereinstimmende Ergebnisse erzielt. In allen untersuchten Populationen kommt das PGM_1^{1+} -Subtypenallel am häufigsten vor. Bei Europiden bewegt sich die Frequenz zwischen 0.6094 (Basken) und 0.6636 (Toulouse). Es folgen die Allele PGM_1^{2+} (England: 0.1420 = niedrigste Frequenz; Barèges: 0.3063 = höchste Frequenz), PGM_1^{1-} (Barèges: 0.0343 = niedrigste Frequenz; Schweden: 0.1600 = höchste Frequenz) und PGM_1^{2-} (Barèges: 0.0094 = niedrigste Frequenz; England: 0.1180 = höchste Frequenz). Die in Süddeutschland gefundenen Allelhäufigkeiten decken sich mit Untersuchungsergebnissen von KUEHNLE u. SPIELMANN (1978) in Hessen, BISSBORT et al. (1978) in Südwestdeutschland und MARTIN (1979) in West-Berlin. SCHERZ et al. (1981) berichteten über gleichlautende Subtypenallelfrequenzen in der Schweiz. Inwieweit bei den übrigen europäischen Populationen eine echte ethnische Variabilität oder technische bzw. statistische Fehler zugrunde liegen, kann erst durch die Auswertung größerer Kollektive geklärt werden.

Die Existenz der PGM_1 -Subtypenallele wurde von WELCH et al. (1978) und MATSUMOTO et al. (1979) an außereuropäischen Populationen nachgewiesen. Die Mongoliden und Negriden zeichnen sich dabei durch eine höhere PGM_1^{1+} -Frequenz aus. Es ist anzunehmen, daß an diesen geographischen bzw. rassischen Unterschieden Selektionsfaktoren beteiligt sind, ohne daß es bislang möglich war, diese zu erfassen.

1.3. Familienuntersuchungen

Zur Erstellung der familiären Phänotypenverteilung wurden aus unserem Material serologische und anthropologisch-erbbiologische Untersuchungsfälle herangezogen, in denen die Vaterschaft als "sehr wahrscheinlich" bzw. als "praktisch erwiesen" angesehen werden kann. Die folgende Tab. zeigt die Segregation der Kinderphänotypen bei 264 Elternpaaren aus Süddeutschland.

Tab. 6 Verteilung der PGM₁-Phänotypen bei 264 Elternpaaren mit insgesamt 264 Kindern

Eltern	n	Kinder										
		1+	1+1-	1-	1+2+	1+2-	1-2+	1-2-	2+	2+2-	1+4	1+0
1+ x 1+	37	37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1+ x 1+1-	28	8	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1+ x 1-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1+ x 1+2+	64	31	-	-	33	-	-	-	-	-	-	-
1+ x 1+2-	10	5	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-
1+ x 1-2+	11	-	3	-	8	-	-	-	-	-	-	-
1+ x 1-2-	2	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-
1+ x 2+	6	-	-	-	6	-	-	-	-	-	-	-
1+ x 2+2-	3	-	-	-	2	1	-	-	-	-	-	-
1+1- x 1+1-	11	1	7	3	-	-	-	-	-	-	-	-
1+1- x 1-	3	-	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-
1+1- x 1+2+	25	6	4	-	7	-	8	-	-	-	-	-
1+1- x 1+2-	5	2	1	-	-	1	-	1	-	-	-	-
1+1- x 1-2+	6	-	1	0	2	-	3	-	-	-	-	-
1+1- x 2+	5	-	-	-	3	-	2	-	-	-	-	-
1+1- x 2+2-	2	-	-	-	2	0	0	0	-	-	-	-
1- x 1+2+	3	-	2	-	-	-	1	-	-	-	-	-
1- x 1+2-	1	-	0	-	-	-	-	1	-	-	-	-
1- x 1-2+	1	-	-	0	-	-	1	-	-	-	-	-
1- x 2+2-	1	-	-	-	-	-	0	1	-	-	-	-
1+2+ x 1+2+	10	3	-	-	4	-	-	-	3	-	-	-
1+2+ x 1+2-	7	0	-	-	2	4	-	-	-	1	-	-
1+2+ x 1-2+	4	-	0	-	1	-	2	-	1	-	-	-
1+2+ x 1-2-	2	-	0	-	-	0	0	-	-	2	-	-
1+2+ x 2+	4	-	-	-	1	-	-	-	3	-	-	-
1+2+ x 2+2-	2	-	-	-	2	0	-	-	0	0	-	-
1+2- x 1+2+	1	-	0	-	1	-	-	0	-	0	-	-
1+2- x 1+2-	1	-	1	-	-	0	-	0	-	-	-	-
1+2- x 2+	2	-	-	-	2	-	-	-	-	0	-	-
1+2- x 1-2+	1	-	-	0	-	-	1	-	0	-	-	-
1+2- x 2+	1	-	-	-	-	-	1	-	0	-	-	-
1+2- x 2+2-	1	-	-	-	-	-	1	0	0	0	-	-
1+ x 1+6	1	0	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
1+2+ x 2+4	1	-	-	-	0	-	-	-	0	-	1	-
1+ x 2+0	1	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	1
Summe	264	93	42	5	76	12	20	3	7	3	1	1

Bei 264 'sicheren Gutachtenfamilien' wurden insgesamt 35 verschiedene Phänotypenkonstellationen gefunden. Die Aufspaltung bei den Kindern ergab keine abweichende, den Mendel'schen Regeln widersprechende Phänotypen. In der Phänotypenverteilung der Geschlechter konnten wir keinen Unterschied feststellen. Das formalgenetische Modell von vier häufigen PGM_1 -Subtypen-allelen wird gleichfalls durch die Familienuntersuchungen von KUEHNLE u. SPIELMANN (1978), SUTTON u. BURGESS (1978) und WELCH et al. (1978) bestätigt. Mit diesen Untersuchungen wurde zugleich auf die Unabhängigkeit der PGM_1 -Untertypen vom PGM_2 -Locus hingewiesen.

Bei der Elternkombination $\text{PGM}_1 1+1+ \times \text{PGM}_1 1+1-$ wurde eine etwas unterschiedliche Häufigkeitsverteilung bei den Kinderphänotypen festgestellt. Die häufigere Beobachtung von $\text{PGM}_1 1+1-$ läßt sich wahrscheinlich auf die noch relativ geringe Zahl der Familien, bei denen nur ein Kind zur Untersuchung kam, zurückführen. Ob in diesem Fall eventuell noch unbekannte Selektionsfaktoren eine Rolle spielen, läßt sich gegenwärtig nicht beantworten. Erst umfangreichere Familiendaten werden hierzu eine genauere Aussage ermöglichen.

In Tab. 6 finden sich am Schluß drei Phänotypenkonstellationen, in denen jeweils ein Elternteil heterozygoter Träger einer seltenen Erbanlage ist. Bei einem Fall wurde die seltene Anlage PGM_1^4 bei Mutter und Kind gefunden, in einem anderen erbte das Kind (Genotyp $\text{PGM}_1^{1+}/\text{PGM}_1^6$) die seltene Anlage von seinem 'Vater'. Ein weiterer Untersuchungsfall ergab zwischen Kind und Eventualvater eine entgegengesetzte Homozygotie (Mutter $\text{PGM}_1 1+1+$, Kind $\text{PGM}_1 1+1+$, Eventualvater $\text{PGM}_1 2+2+$). Der isolierte PGM_1 -Ausschluß wurde durch die Untersuchung von 24 weiteren Merkmalsystemen (W-Wert = 99.9%) in Frage gestellt. Die auffallend schwächeren PGM_1 -Banden bei Kind und Eventualvater legten die Existenz eines 'stummen' Allels nahe.

Das erweiterte PGM_1 -System wird vom Bundesgesundheitsamt als 'noch ein in der wissenschaftlichen Entwicklung befindliches System' angesehen. Nachdem die Anforderungen nunmehr weitgehend erfüllt sind, dürfte einer baldigen Anerkennung nichts mehr im Wege stehen.

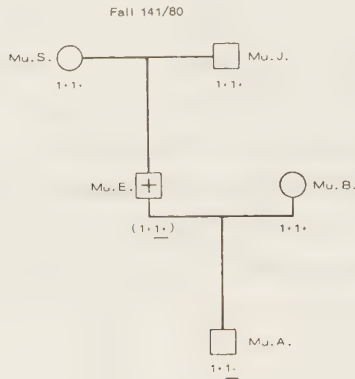
1.4. Anwendung in der Abstammungsbegutachtung

Zur Feststellung des biologischen Vaters eines nichtehelichen Kindes müssen nach Möglichkeit alle erreichbaren Beweise erhoben werden, die geeignet sind, die Abstammung zu klären. Nach § 1600 o Abs. 1 BGB bedeutet Vaterschaft die Abstammung des Kindes von dem Erzeuger. Da diese biologische Gemeinsamkeiten zwischen beiden bedingt, können daraus mehr oder weniger weitgehende Schlüsse auf die Abstammung und damit auf die Vaterschaft gezogen werden. Der naturwissenschaftlichen Begutachtung kommt deswegen eine besondere Bedeutung zu. Sie kann positive Hinweise für das Bestehen der Paternität und negative geben, die gegen sie sprechen. In der Praxis kommen hauptsächlich vier Arten medizinischer Gutachten in Betracht:

1. das geburtshilflich-gynäkologische Gutachten (Tragezeitgutachten);
2. das andrologische oder Fertilitätsgutachten;
3. das Blutgruppengutachten und
4. das anthropologisch-erbbiologische Gutachten.

Eines der wichtigsten Beweismittel ist das blutgruppen-serologische Gutachten. Dafür werden Blutproben des Kindes, seiner Mutter und des angeblichen Vaters benötigt. Eine Begutachtung kann auch erfolgen, wenn die Mutter verstorben oder nicht erreichbar ist (eventuell zusammen mit Blutgruppenbefunden ihrer Eltern oder Geschwister). Ist der vermutliche Vater verstorben oder nicht greifbar, dann können Blutgruppenbefunde von dessen Eltern oder anderen Blutsverwandten zur Abstammungsbegutachtung herangezogen werden. Die Aussicht, auf diese letztere Weise eine Nichtvaterschaft zu erkennen, ist gegenüber normalen Fällen nur um etwa 1/3 reduziert. Ein solch ähnlicher Fall, bei dem es um die indirekte Klärung der Abstammung eines nichtehelichen Kindes ging, wurde von uns kürzlich untersucht.

Abb. 12 Isolierter Ausschluß durch Subtypisierung im PGM_1 -System



Im vorliegenden Untersuchungsfall (141/80) ging es um die Klärung der Vaterschaft des Kindes Mü. A. Der mutmaßliche Vater Mü. E. war verstorben. Aufgrund dessen wurden zur Klärung der Abstammung die Eltern des Verstorbenen in die blutgruppenserologischen Untersuchungen mit einbezogen. Bei der Untersuchung von insgesamt 10 Blutgruppen-, 6 Serumprotein- und 8 Enzymsystemen ergab sich außer im PGM_1 -System kein weiterer Ausschluß. Das Kind, das den Phänotyp PGM_1^{1+1-} besitzt, kann nach unseren Untersuchungen die genetische Anlage PGM_1^{1-} nicht vom Eventualvater geerbt haben, wenn die wahren Eltern des Verstorbenen jeweils den Phänotyp PGM_1^{1+1+} besitzen. Eine Fehltypisierung oder Vertauschung der Proben kommt nicht in Frage, da eine Wiederholung an frischem Material zu dem gleichen Ergebnis führte. Nach den erhobenen Befunden kann der als Vater inculpierte Verstorbene nicht als Erzeuger des Kindes Mü. A. in Betracht kommen. Mit herkömmlichen Elektrophoreseverfahren hätte diese Untersuchung im PGM_1 -System zu keiner Klärung geführt.

Tab. 7 zeigt die gefundenen Ausschlüsse im PGM_1 -System.

Tab. 7 Ausschlüsse durch Subtypisierung im PGM₁-System

Untersuchte Fälle	n	Ausschlüsse			Summe
		Kläger	Beklagte	Zeugen	
Ein-Mann-Fälle	252	8	16	0	24
Zwei-Mann-Fälle	70	5	4	8	17
Drei-Mann-Fälle	13	0	2	10	12
Vier-Mann-Fälle	3	0	1	3	4
Sechs-Mann-Fälle	1	0	0	0	0
Summe	339	13	23	21	57

Andere Systeme:	ABO	Kell	Hp	Pi	GPT
	MNSs	Lu	C3	acP	EsD
	Rh	P	Bf	AK	GLO
	Fy	Gm	Tf	ADA	HLA
	Kidd	Inv	Gc	6-PGD	

In 339 untersuchten Ein- und Mehr-Mann-Fällen wurden insgesamt 13 Kläger, 23 Beklagte und 21 Zeugen von der angeblichen Vaterschaft im PGM₁-System ausgeschlossen. Unter Einbeziehung der übrigen Systeme können drei Ausschlüsse davon als isoliert angesehen werden.

Die gute Lagerungsstabilität und günstige Allelenverteilung erhöhen die Bedeutung dieses Systems in der Vaterschaftsbegutachtung. Nach der folgenden Formel läßt sich die für die Begutachtung wichtige Allgemeine 'isolier-te' Vaterschaftsausschlußchance (abgekürzt: AVACH oder P) berechnen (VOGEL u. HELMBOLD, 1972):

$$\begin{aligned}
 P = & pq (1 - pq) + pr (1 - pr) + ps (1 - ps) + \\
 & qr (1 - qr) + qs (1 - qs) + \\
 & rs (1 - rs) + \\
 & 4 (pqrs) (pq + pr + ps + qr + qs + rs)
 \end{aligned}$$

wobei p, q, r und s die Frequenzen der Subtypenallele bezeichnen.

Für das erweiterte PGM₁-System ergibt sich demnach eine theoretische Ausschlußwahrscheinlichkeit von 25.3%. Die praktische Ausschlußchance beträgt 16.8 %. Dabei kamen sämtliche Fälle mit PGM₁-Ausschlüssen nach der Subtypisierung zur Berechnung.

Die kombinierte Ausschlußchance für verschiedene Systeme berechnet sich nach der Formel von STEINHAUS (zit. nach VOGEL u. HELMBOLD, 1972):

$$P = 1 - (1 - P_1) (1 - P_2) \dots$$

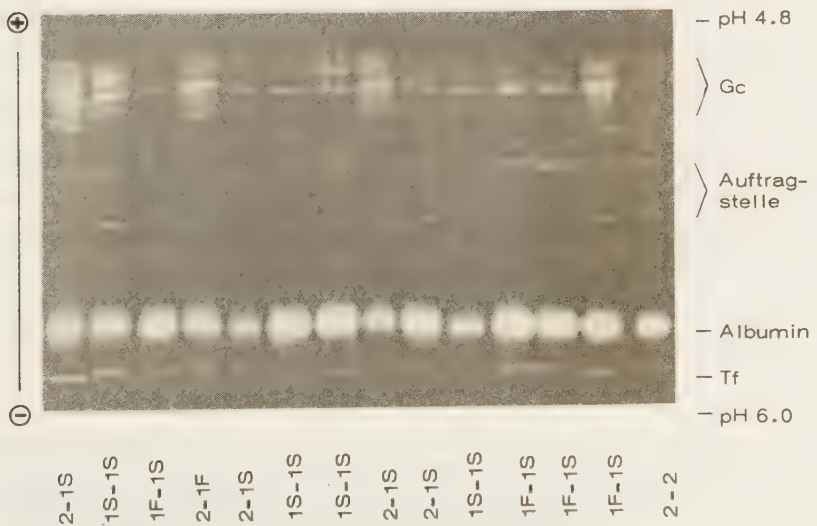
wobei P₁, P₂ usw. die Ausschlußchancen für die einzelnen Systeme sind.

2. Gc-Subtypisierung

2.1. Klassifizierung der Phänotypen

Der Strukturpolymorphismus der gruppenspezifischen Komponente (Gc) wurde mittels der isoelektrischen Fokussierung auf Polyacrylamidgelen (PAGIF) untersucht. Als Ausgangsmaterial dienten vornehmlich frische Sera, die mit Filterplättchen auf das vorgekühlte Gel aufgetragen wurden. Eine Präfokussierung war nicht erforderlich.

Abb. 13 Gc-Phänotypen nach 180 min. PAGIF (pH-Bereich 4-6.5)



Die Gc-Typen wurden mit zwei unterschiedlichen Methoden bestimmt. Abb. 13 zeigt eine Simultandarstellung der Gc-Proteine und Transferrine (Tf) nach 180 minütiger Fokussierung (PAG-plate, pH 4-6.5) und anschließender Fixierung in Sulfosalicylsäurelösung. Im Bereich von pH 4.9-5.1 lassen sich sechs häufige Phänotypen Gc 1S-1S, 1F-1S, 1F-1F, 2-1F, 2-1S und 2-2 differenzieren. Die Untertypen von Gc 1-1 unterscheiden sich dabei nur geringfügig in ihren isoelektrischen Punkten, d.h. die Banden

von Gc 1F-1F liegen im Vergleich zu Gc 1S-1S nur ein wenig weiter anodisch ($\Delta pH \approx 0.02$). Der Typ Gc 2-2, für den bislang keine Untergruppen nachgewiesen werden konnten, zeigt im pH-Bereich von 5.1 ein Einzelbandenmuster. Bei den Heterozygoten Gc 2-1F und Gc 2-1S findet man entsprechend ein Dreibandmuster. Beachtenswert ist die Möglichkeit des Auftretens von Konversionsprodukten nach längerer Lagerung oder mehrfach wiederholtem Einfrieren und Auftauen von Serumproben. CLEVE u. PATUTSCHNICK (1979) zeigten, daß eine Neuraminidasebehandlung den anodalen Teil der Gc 1F- und Gc 1S-Banden in den kathodalen Teil transformiert, so daß die 'Doppelbanden-Varianten' 1F und 1S dann als 'Einfachbanden-Varianten' erscheinen. Analog dazu wird beim heterozygoten Typ Gc 1F-1S aus dem ursprünglichen Vierbandenmuster ein Zweibandmuster. Diese Veränderungen werden auf einen Verlust an Neuraminsäureresten am Gc-Protein zurückgeführt.

Nach der direkten Gelfixierung war es manchmal schwierig einzelne Gc-Typen einwandfrei zu identifizieren. Um eventuelle Typisierungsfehler (nicht vollständige Proteinfällung, Fremdproteine, Artefakte) zu vermeiden, wurden die Proben mit einer Zweitmethode (PAGIF-Immunfixation) untersucht. Die Immunfixation mit einem monospezifischen Anti-Human Gc-Antiserum (Behringwerke TNA 04) ermöglichte eine sichere Klassifizierung sämtlicher Gc-Typen.

Abb. 14 Klassifizierung der Gc-Phänotypen mittels PAGIF (pH 4-6) und darauffolgender Immunfixation (Antikörper-Verdünnung 1:2)

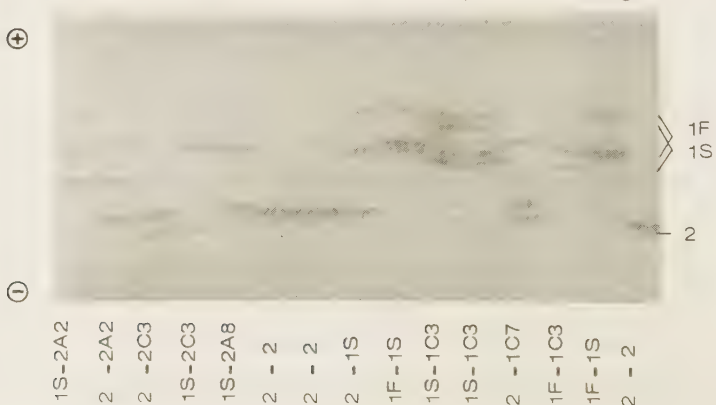
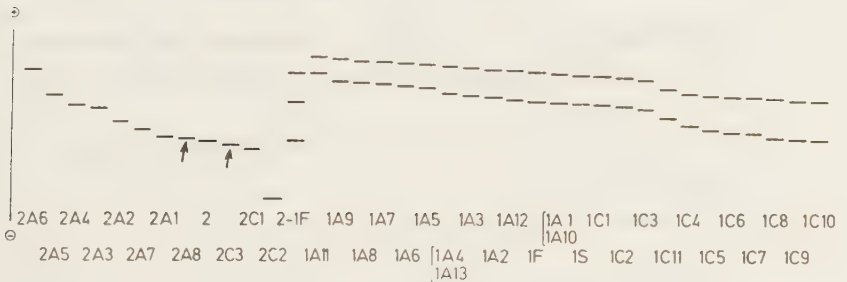


Abb. 14 zeigt nach der Immunfixation neben den häufigen Typen Gc 1F-1S, 2-1F, 2-1S und 2-2, die seltenen Varianten Gc 1C3, 1C7, 2A2, 2A8 und 2C3 im heterozygoten Zustand. In unserem Untersuchungsgut fanden sich außer den seltenen Typ Gc 1S-1C3 zwei neue Varianten, die wir als Gc 2A8 und Gc 2C3 bezeichneten. Zur Klassifizierung dieser seltenen Typen wurden Standardproben herangezogen (von Herrn Prof. Cleve freundlicherweise zur Verfügung gestellt).

Abb. 15 Schematische Darstellung der beobachteten Gc-Phänotypen nach PAGIF (modifiziert nach CLEVE et al., 1981)



In Abb. 15 sind neben den Typen Gc 1F, 1S, 2-1F und 2 insgesamt 11 genetische Varianten (Gc 2A1-2A8 und Gc 2C1-2C3) mit einem Einzelbandenmuster sowie 22 genetische Varianten (Gc 1A1-1A13 und Gc 1C1-1C11) mit einem Doppelbandenmuster schematisch dargestellt. Die Bezeichnungen A (anodal) und C (cathodal) beziehen sich auf die Position der Varianten innerhalb des Trenngels (isoelektrischer Punkt bzw. elektrophoretische Mobilität). Für die Zuordnung dienten die Typen Gc 1S und Gc 2 als Standards. Die von uns kürzlich gefundenen Varianten Gc 2A8 und Gc 2C3 besitzen ein Einzelbandenmuster. Während die Bande von Gc 2A8 nur wenig anodal zu Gc 2 liegt, findet man die Bande von Gc 2C3 etwas kathodal davon (siehe Pfeile).

Auf dem I. Internationalen Gc-Workshop in Paris 1978 hat man eine Reihe von Varianten typisiert und nach der neuen Nomenklatur bezeichnet (CONSTANS u. CLEVE, 1979). Dabei zeigte sich, daß einzelne Gc-Typen aufgrund von ähnlichen isoelektrischen Punkten allein mit der PAGIF-Methode nicht unterschieden werden können. Für die Beschreibung einer neuen Variante empfiehlt sich neben einer Erbgangsanalyse (Familienuntersuchung) die Untersuchung mit einer Zweitmethode (PAG-Elektrophorese, Immunelektrophorese).

2.2. Populationsgenetische Untersuchungen

2.2.1. Verteilung der Gc-Phänotypen und Allelfrequenzen

Das Untersuchungsgut für die Populationsgenetik ist ein Bestandteil der nichtverwandten Personen unserer Familienuntersuchung.

Tab. 8 Gc-Phänotypenverteilung und Allelfrequenzen in Süddeutschland

Phänotypen	Beobachtet		Erwartet		Allel- frequenzen
	n	%	n	%	
Gc 1S- 1S	258	35.44	264.09	36.28	$Gc^{1S} = 0.6023$
1F - 1S	130	17.85	124.00	17.03	$Gc^{1F} = 0.1414$
1F - 1F	14	1.92	14.56	2.00	$Gc^2 = 0.2549$
2 - 1S	229	31.46	223.53	30.70	$Gc^* = 0.0014$
2 - 1F	48	6.59	52.48	7.21	
2 - 2	47	6.46	47.30	6.50	
1S- 1C3	1	0.14	1.02	0.14	
2 - 2C3	1	0.14	1.02	0.14	
Summe	728	100.00	728.00	100.00	

Gc^* = Frequenz seltener Gc-Allele

$$\sum \chi^2 = 0.9685; df = 3; P > 0.20$$

Die Verteilung der Gc-Subtypen wurde an einer Stichprobe von 728 nicht-verwandten Personen aus Süddeutschland überprüft (Tab. 8). Dabei ließ sich die Existenz von zwei häufigen Gc¹-Subtypenallelen bestätigen. Die Häufigkeit der beiden Subtypenallele Gc^{1F} (0.1414) und Gc^{1S} (0.6023) entsprach der früheren Gc¹-Genfrequenz (0.70 - 0.76 für Mitteleuropäer). In unserem Untersuchungsgut fanden sich außer den sechs häufigen Phänotypen Gc 1S-1S, 1F-1S, 1F-1F, 2-1F, 2-1S und 2-2 die seltenen Typen, Gc 1S-1C3 und Gc 2-2C3. Die beobachteten Werte stimmen mit den Erwartungswerten gut überein.

2.2.2. Vergleich populationsgenetischer Daten

In der folgenden Tabelle sind die Allelfrequenzen von einigen europäischen außereuropäischen Populationen zusammengestellt.

Tab. 9 Verteilung der Gc-Allelfrequenzen in verschiedenen Populationen

Populationen	Kollektiv n	Allelfrequenzen			
		Gc ^{1S}	Gc ^{1F}	Gc ²	Gc [*]
Deutsche (München) Cleve et al. (1978)	440	0.5920	0.1443	0.2614	0.0023
Deutsche (Hessen) Kühnl et al. (1978)	758	0.5917	0.1458	0.2619	0.0006
Deutsche (Süddeutsch- land) Eigene Unter- suchung	728	0.6023	0.1414	0.2549	0.0014
Italiener (Ferrara) Cleve et al. (1978)	147	0.5884	0.1497	0.2619	-
Pyrenäen (Südfrank- reich) Constans et al. (1978)	290	0.5120	0.0770	0.4100	-
Drusen (Israel) Cleve et al. (1978)	195	0.5436	0.2231	0.2308	0.0025
Indianer (Bolivien) Constans et al. (1978)	253	0.6360	0.2310	0.1220	0.0090
Pygmäen (Zentral- afrika) Constans et al. (1978)	267	0.1910	0.5840	0.0640	(0.1610) ⁺
Japaner Omoto et al. (1978)	305	0.2590	0.4656	0.2574	0.0180

Gc^{*} = Frequenz seltener Gc-Varianten

()⁺ = Frequenz von Gc^{Ab} und Gc^{2a}

Aus den vorliegenden Ergebnissen ist zu ersehen, daß die Allelhäufigkeiten bei den bislang untersuchten weißen Populationen Europas relativ gut übereinstimmen. Die populationsgenetische Untersuchung in Süddeutschland deckt

sich mit den Allelfrequenzen einer früheren Untersuchung von CLEVE et al. (1978) in München und Norditalien. KUEHNEL et al. (1978) fanden eine ähnliche Verteilung der Gc-Allele in der hessischen Bevölkerung. In allen Populationen kommt dabei Gc¹ wesentlich häufiger vor als Gc². Auffällig ist die unterschiedliche Verteilung der Subtypenallele von Gc¹ bei den verschiedenen Rassen. In einer Stichprobe von 290 Personen aus Südfrankreich wurde von CONSTANS et al. (1978) der niedrigste Wert für Gc^{1S} (0.5120) und Gc^{1F} (0.0770) für eine europäische Bevölkerung angegeben. CLEVE et al. (1978) fanden bei 195 untersuchten Drusen in Israel eine höhere Frequenz für das Subtypenallel Gc^{1F}. Die Allelfrequenzen für Gc^{1S} und Gc² liegen im Vergleich zu europäischen Bevölkerungsgruppen dagegen etwas niedriger.

In fremdrassischen Populationen (zentralafrikanische Pygmäen, südamerikanische Indianer, Japaner) fand man für Gc^{1F} ebenfalls höhere Werte als bei Europiden. Es wird angenommen, daß zwischen der höheren Gc^{1F}-Allelhäufigkeit und der stärkeren Pigmentierung einzelner Rassen ein Zusammenhang besteht. Weitere Untersuchungen, auch an Populationen anderer rassischer Zugehörigkeit, sind geboten. Das Vorkommen von Gc-Varianten ist recht unterschiedlich. Während die Variantenhäufigkeit für Europide unter 0.5% liegt, fand man in fremden Populationen einzelne rassenspezifische Varianten mit relativ hohen Werten.

Abb. 16 Geographische Verteilung der Allele Gc^{1S} und Gc² (ergänzt nach CONSTANS et al., 1979)

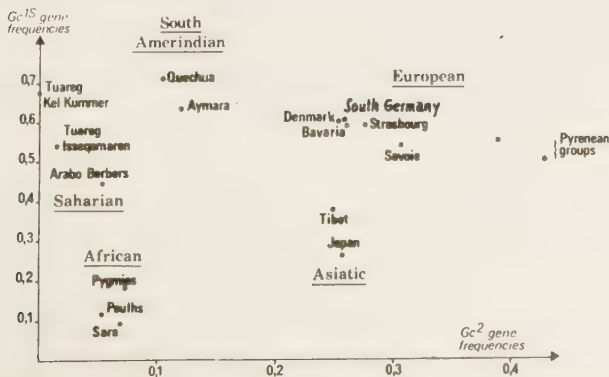


Abb. 16 zeigt die Verteilung verschiedener menschlicher Populationen nach ihren Allelhäufigkeiten für Gc^{1S} und Gc^2 . Dabei nimmt die mongolide Rasse eine intermediäre Position zwischen europäischen und afrikanischen Populationen ein. Afrikanische Populationen und Populationen des Mittleren Ostens zeigen bei einer ähnlichen Frequenz für Gc^2 z.T. beträchtliche Unterschiede in ihrer Allelhäufigkeit für Gc^{1S} . Einzelne isoliert lebende Bevölkerungsgruppen in Europa, wie z.B. die Pyrenäen, zeigen ebenso stark abweichende Genfrequenzen.

Frühere populationsgenetische Untersuchungen von KIRK et al. (1963) sowie MOURANT et al. (1976) ließen erkennen, daß zwischen der Sonnenlichtverteilung und der unterschiedlichen Verteilung der verschiedenen Gc -Typen ein gewisser Zusammenhang besteht. Mit wenigen Ausnahmen, fand man z. B. für Gc^2 durchschnittlich niedrige Werte in Gebieten mit starker Sonneneinstrahlung und hohe Werte in solchen Gebieten mit weniger Sonnenschein. Weitergehende Untersuchungen verschiedener Typen des Vitamin D transportierenden Proteins durch DAIGER u. CAVALLI-SFORZA (1977) führten zu einem ähnlichen Ergebnis. Man darf also annehmen, daß natürliche Selektionsfaktoren für die Aufrechterhaltung des genetischen Polymorphismus eine wesentliche Rolle spielten.

2.3. Familienuntersuchungen

Für die Familienuntersuchungen wurden aus unserem Untersuchungsgut nur Fälle herangezogen, in denen die Vaterschaft als "sehr wahrscheinlich" ($W \geq 95\%$ und $\leq 99\%$) oder als "praktisch erwiesen" ($W \geq 99.73\%$) galt. Tab. 10 zeigt die Verteilung der Gc -Phänotypen bei den von uns untersuchten 171 Elternpaaren und ihren Kindern.

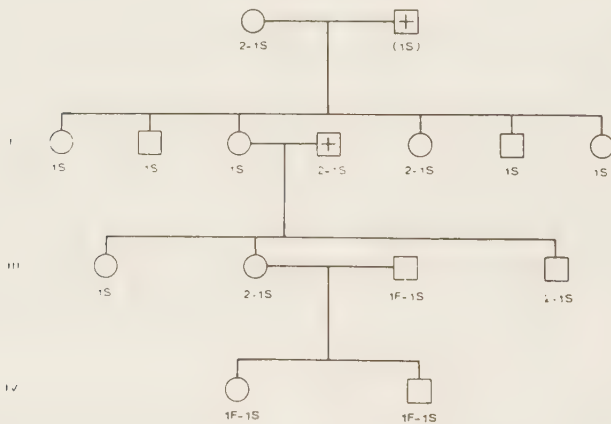
Tab. 10 Gc-Phänotypenverteilung bei 171 Elternpaaren mit insgesamt 171 Kindern

Eltern-			Kinderphänotypen					
kombinationen	n		1S	1F-1S	1F	2-1S	2-1F	2
1S x 1S	19 (22.5)		19 (19.0)	-	-	-	-	-
1S x 1F-1S	21 (21.1)		13 (10.5)	8 (10.5)	-	-	-	-
1S x 1F	4 (2.5)		-	4 (4.0)	-	-	-	-
1S x 2-1S	40 (38.1)		19 (20.0)	-	-	21 (20.0)	-	-
1S x 2-1F	10 (8.9)		-	7 (5.0)	-	3 (5.0)	-	-
1S x 2	7 (8.1)		-	-	-	7 (7.0)	-	-
1F x 1F-1S	3 (1.2)		-	2 (1.5)	1 (1.5)	-	-	-
1F-1S x 1F-1S	2 (4.9)		1 (0.5)	1 (1.0)	0 (0.5)	-	-	-
1F-1S x 2-1S	32 (8.9)		11 (8.0)	8 (8.0)	-	8 (8.0)	5 (8.0)	-
1F-1S x 2-1F	3 (2.1)		-	0 (0.75)	0 (0.75)	2 (0.75)	1 (0.75)	
1F-1S x 2	2 (1.9)		-	-	-	1 (1.0)	1 (1.0)	
2-1S x 2-1S	13 (16.1)		3 (3.25)	-	-	5 (6.5)	-	5 (3.25)
2-1S x 2-1F	5 (3.8)		-	3 (1.25)	-	0 (1.25)	1 (1.25)	1 (1.25)
2-1S x 2	7 (6.8)		-	-	-	2 (3.5)	-	5 (3.5)
2-1F x 2	1 (1.6)		-	-	-	-	0 (0.5)	1 (0.5)
2 x 2	1 (0.7)		-	-	-	-	-	1 (1.0)
2-1S x 1S-1C3	1 (0.08)		0 (0.5)	-	-	1 (0.5)	-	-
Summe	171		66	33	1	50	8	13

Die Erwartungswerte stehen neben den beobachteten Werten in Klammern.

Bei den insgesamt 17 verschiedenen elterlichen Phänotypenkombinationen fand sich in der Kindergeneration keine Abweichung vom angenommenen autosomal kodominanten Erbgang. In allen entsprechenden Elternkombinationen weichen die Phänotypenproportionen nur rein zufällig von einfachen Mendel-Proportionen ab. Durch diese Befunde wird, wie schon in früheren Familienuntersuchungen (CONSTANS et al., 1978; CLEVE et al., 1978; WEIDINGER et al., 1981), das formalgenetische Modell von drei häufigen Gc-Allelen in unserer Bevölkerung bestätigt.

Abb. 17 Erbgang der Gc-Allele im Stammbaum der Familie JUR



Im Stammbaum der Großfamilie JUR läßt sich der Erbgang der Gc-Allele über vier Generationen verfolgen. Bei den verstorbenen Männern aus der 1. und 2. Generation könnte es sich um die angegebenen, in Klammern gesetzten Genotypen handeln, da wir in der jeweils nachfolgenden Generation nur die Phänotypen Gc $1S \cdot 1S$ und Gc $2 \cdot 1S$ beobachten konnten. Diese Typisierung wurde aufgrund eines Hinweises für das Vorkommen eines "stummen" Alleles im Gc-System gemeinsam mit Herrn Prof. Cleve durchgeführt.

2.4. Anwendung in der Paternitätsbegutachtung

Nicht alle erblichen Merkmalsysteme des Blutes sind für die Abstammungs- oder Paternitätsbegutachtung geeignet. Für diese Untersuchungen müssen einige wichtige Voraussetzungen erfüllt sein:

1. Vorliegen eines Polymorphismus, d.h. es müssen unterschiedliche phänotypische Ausprägungen (verschiedene Allele) vorkommen
2. Nachweis der spezifischen Aktivität des beobachteten Isoprotein-/Isoenzymusters (Immunfixation, Substratspezifität)
3. Vergleichsuntersuchung mit verschiedenen Elektrophoresetechniken
4. Übereinstimmung von beobachteten und erwarteten Werten bei größeren Kollektiven ($n > 500$) nichtverwandter Personen
5. Erbgang durch Familienuntersuchungen gesichert
6. Nachweis des Polymorphismus bereits im frühen Kindesalter (6. - 9. Lebensmonat)
7. Lagerungs- und Altersstabilität des Merkmals
8. Günstige Allelenverteilung in der Bevölkerung (informativer Polymorphismus)
9. Frequenz stummer Gene und quantitativer Varianten annähernd bekannt
10. Übereinstimmung des formalgenetischen Modells der Subtypenallele mit den korrespondierenden Phänotypen bei konventioneller Trenntechnik
11. Nachweisteknik muß relativ einfach, praktikabel und reproduzierbar sein

Diese genannten Voraussetzungen können für das Gc-System als weitgehend erfüllt angesehen werden. Aufgrund der günstigen Allelenverteilung und dem gesicherten Erbgang kommt der Gc-Bestimmung in der Vaterschaftsbegutachtung ein besonderer Stellenwert zu.

Tab. 11 Ausschlüsse im Gc-System

Untersuchte Fälle	n	Ausschlüsse			Summe
		Kläger	Beklagte	Zeugen	
Ein-Mann-Fälle	224	10	13	0	23
Zwei-Mann-Fälle	66	5	7	9	21
Drei-Mann-Fälle	11	0	1	6	7
Vier-Mann-Fälle	4	0	0	0	0
Sechs-Mann-Fälle	1	0	0	1	1
Summe	306	15	21	16	52

Tab. 11 zeigt die komplett ausgewerteten forensischen Fälle, d.h. Fälle, in denen alle in einem Vaterschaftsprozeß verwickelten Personen typisiert werden konnten. Bei 306 untersuchten Ein- und Mehr-Mann-Fällen wurden insgesamt 15 Kläger, 21 Beklagte und 16 Zeugen im Gc-System von der angeblichen Vaterschaft ausgeschlossen. Mit Ausnahme von zwei isolierten Gc-Ausschlüssen decken sich alle übrigen mit den Ausschlüssen in anderen Merkmalsystemen. Bei den isolierten Vaterschaftsausschlüssen ließen sich die erhobenen Befunde durch Nachuntersuchungen an frischem Probenmaterial bestätigen. Mit diesen Wiederholungen konnten wir eine eventuelle Probenvertauschung oder Fehltypisierung ausschließen. Zu den Gc-Ausschlüssen ergaben sich in zahlreichen Untersuchungsfällen wertvolle positive Hinweise für die Vaterschaft. Im Vergleich zur normalen Gc-Bestimmung ließen sich mit der Subtypisierung insgesamt 29 Ausschlüsse (55.8%) mehr feststellen.

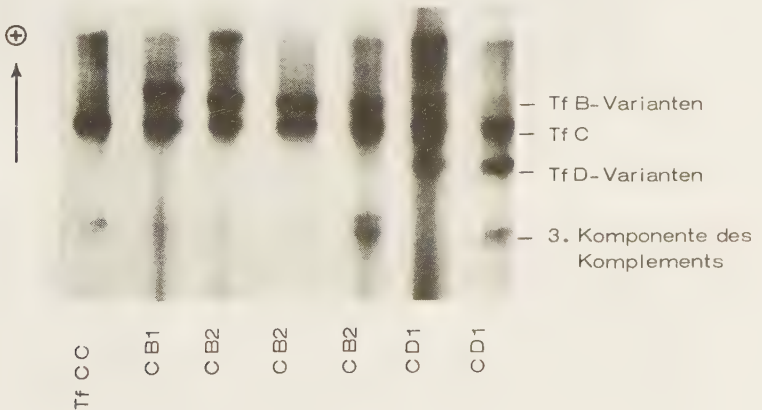
Aufgrund unserer Daten ergibt sich für das erweiterte Gc-System eine praktische Ausschlußchance von 17% und eine theoretische Ausschlußwahrscheinlichkeit von 29.1%.

3. Tf-Subtypisierung

3.1. Phänotypen-Differenzierung

Im Transferrinsystem (Tf) lassen sich mit konventionellen Elektrophorese-Methoden neben dem in den drei großen Rassen am häufigsten vorkommenden Phänotyp Tf C, eine Reihe von schneller wandernden Tf B-Varianten und eine Reihe von langsamer wandernden Tf D-Varianten unterscheiden.

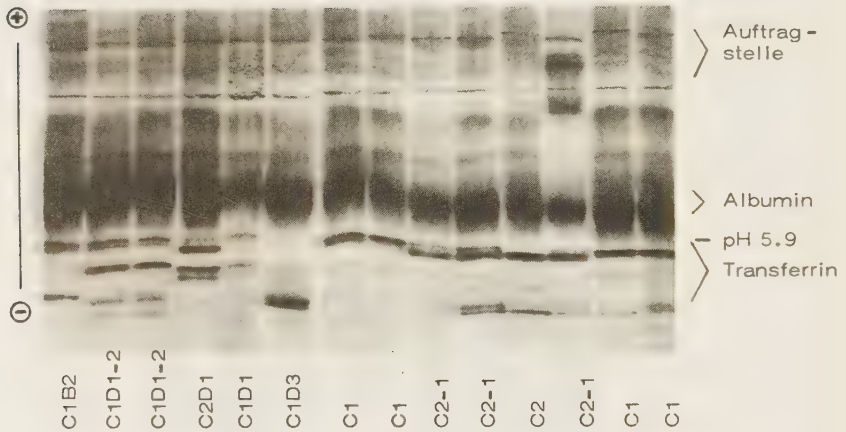
Abb. 18 Tf-Phänotypen nach der Agarosegel-Elektrophorese (Barbitat-Puffer, pH 8.6; Laufzeit 120 min.)



Nach der herkömmlichen elektrophoretischen Auftrennung von Humansera in Agarosegelen zeigt der Phänotyp Tf C(common) ein Einfachbandenmuster (Abb. 18). Die seltenen Tf-Varianten besitzen dagegen im heterozygoten Zustand ein symmetrisches Doppelbandenmuster. Der Proteinnachweis erfolgte gewöhnlich durch Färbung mit Coomassie Blau. Die Agarosegel-Elektrophorese wird auch heute noch zur routinemäßigen Bestimmung der Transferrine verwendet. Eine sichere Differenzierung von Varianten innerhalb einer Gruppe (Tf B oder Tf D) ist mittels dieser Methode manchmal schwierig.

Die Anwendung der isoelektrischen Fokussierung auf Polyacrylamidgelen (PAGIF) erlaubt eine weitergehende Differenzierung der Transferrine. Mit Hilfe dieser hochauflösenden Methode ließen sich erstmals drei häufige Tf C-Subtypen nachweisen (KUEHNEL u. SPIELMANN, 1978_a; THYMAN, 1978).

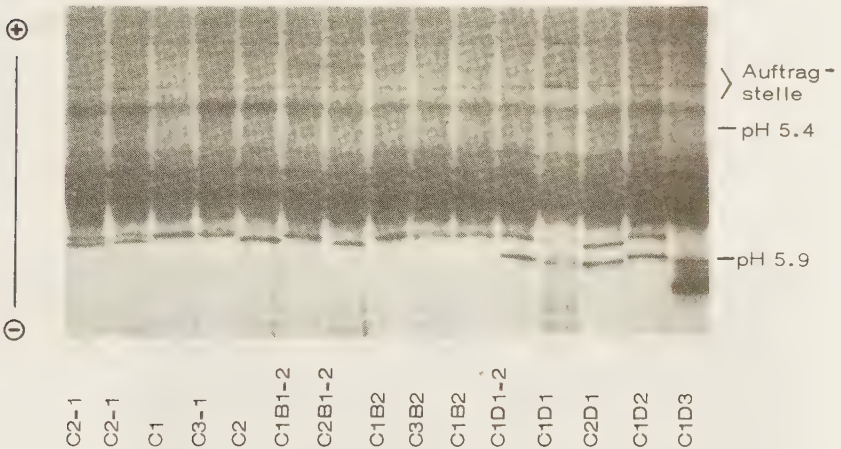
Abb. 19 Tf-Phänotypen nach der Isoelektrofokussierung (PAGIF, pH 4 - 6.5)



Nach der isoelektrischen Fokussierung lassen sich die menschlichen Transferrine im pH-Bereich von 5.9 - 6.1 von anderen Plasmaproteinen unterscheiden. Sie nehmen innerhalb des Trenngels eine kathodale Position gegenüber den Albuminen ein. Der Nachweis für das Eisentransportprotein wurde durch einen Vergleich mit gereinigtem Transferrin (Sigma T 2252, Reinheitsgrad 90 - 95 %) sowie durch eine Immunfixation mit monospezifischem Anti-Human-Tf-Antiserum (DAKO Immunglobuline Boehringer Code-Nr. 10-061) erbracht.

Abb. 19 zeigt die drei häufigen Subtypen Tf C1, C2-1 und C2 neben einigen seltenen Tf B- und Tf D-Varianten. Dieser erweiterte Tf C-Polymorphismus läßt sich durch die Existenz zweier häufiger Subtypenallele (Tf^{C1} und Tf^{C2}) an einem autosomalen Genort erklären. Homozygote weisen den Typ Tf C1 oder Tf C2 auf. Für Heterozygote ist der Typ Tf C2-1 charakteristisch. Nach der Isoelektrofokussierung in Polyacrylamidgelen (pH 4 - 6.5) ergeben sich für Tf C1 und Tf C2 Doppelbandenmuster. Heterozygote vom Typ Tf C2-1 zeigen ein Vierbandenmuster. Die seltenen Transferrinvarianten erscheinen hier im pH-Bereich von 6.0 - 6.1. Sie lassen einfache Banden mit nur geringfügig unterschiedlichen pI-Werten innerhalb einer Gruppe erkennen.

Abb. 20 Tf-Phänotypen nach der PAGIF (pH-Bereich 4 - 6.5). Die Humansera wurden vor der Analyse mit $0.01 \text{ M FeCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ behandelt.

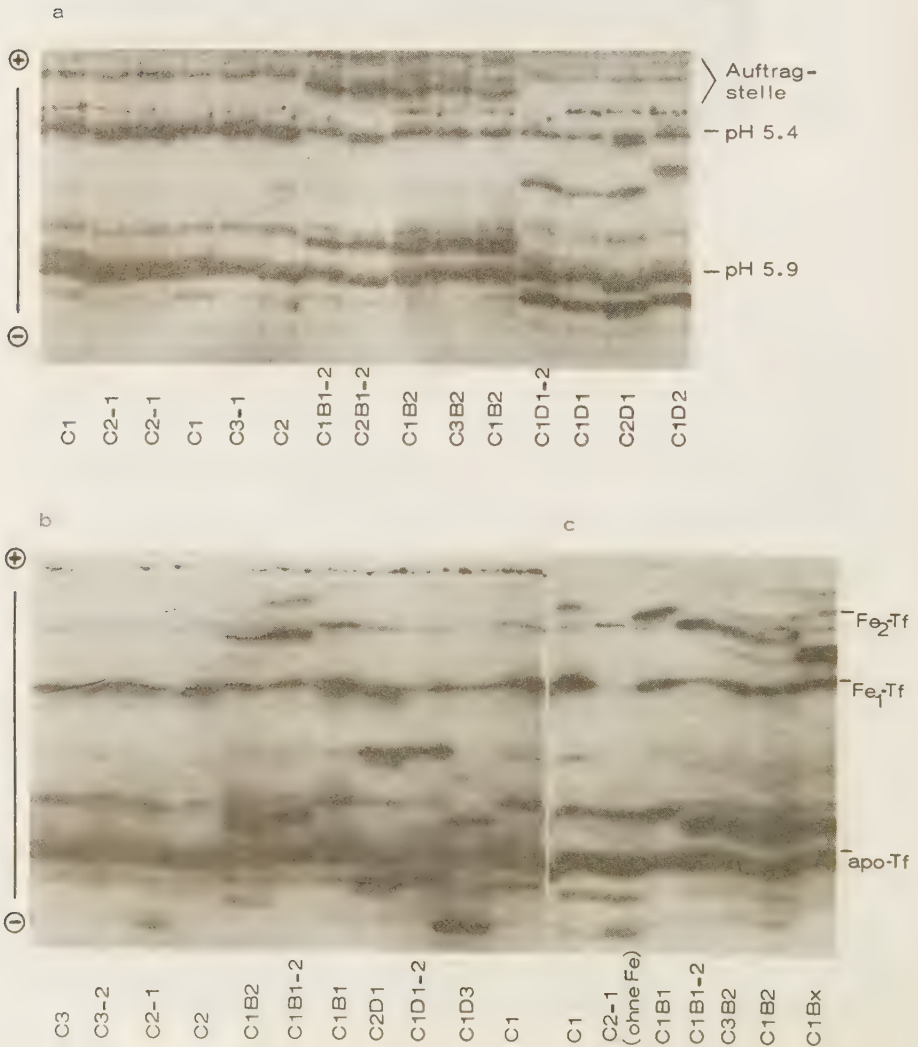


In Abb. 20 sind die häufigen Subtypen Tf C1, C2-1 und C3-1 neben einigen seltenen Tf-Phänotypen dargestellt. Durch Behandlung der Proben mit $0.01 \text{ M FeCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ wandert der isoelektrische Punkt der Transferrine etwas mehr in den sauren pH-Bereich. Man kann deshalb im pH-Bereich von 5.4 eine zusätzliche, scharf abgegrenzte Transferrinzone beobachten, in der sich ein weiteres Allelprodukt nachweisen läßt. Das neue Allelprodukt Tf C3, das aus der Aufspaltung von Tf C1 resultiert, nimmt dabei eine intermediäre Position zwischen Tf C1 und Tf C2 ein. Die Differenz gegenüber Tf C1 beträgt weniger als 0.015 pH-Einheiten. Durch die Eisenbehandlung werden aber auch die Tf-Banden im pH-Bereich von 5.9 modifiziert. Die Subtypen Tf C1 und Tf C2 zeigen durch das Verschwinden der kathodenwärts gelegenen Banden jetzt nur noch eine einzelne kräftige Bande. Heterozygote vom Typ Tf C2-1 besitzen entsprechend ein symmetrisches Doppelbandenmuster. Ähnliche Doppelbanden lassen sich auch aus einer Mischung gleicher Probenanteile von Tf C1 und Tf C2 reproduzieren. Eine Differenzierung der Subtypen Tf C3, 3-1 und 3-2 ist allerdings in dieser Zone nicht möglich.

Auch die Transferrinvarianten zeigen nach der Eisenbehandlung ein abgewandeltes Bandenmuster. Die zusätzlich auftretenden Einfach- bzw. Doppelbanden der Tf B- und Tf D-Varianten nehmen nach der isoelektrischen Fokussierung im Bereich

zwischen pH 5.2 und 5.6 anodale und/oder kathodale Positionen gegenüber der neuen Tf C-Typisierungszone (pH 5.4) ein. Die Phänotypendifferenzierung wird allerdings nach der Coomassie-Färbung durch die regelmäßige Überlagerung anderer Proteine erschwert.

Abb. 21 Tf-Phänotypen nach der Elektrofokussierung und darauffolgender Immunfixation. Die Humansera wurden mit 0.01 M FeCl_3 vorbehandelt.



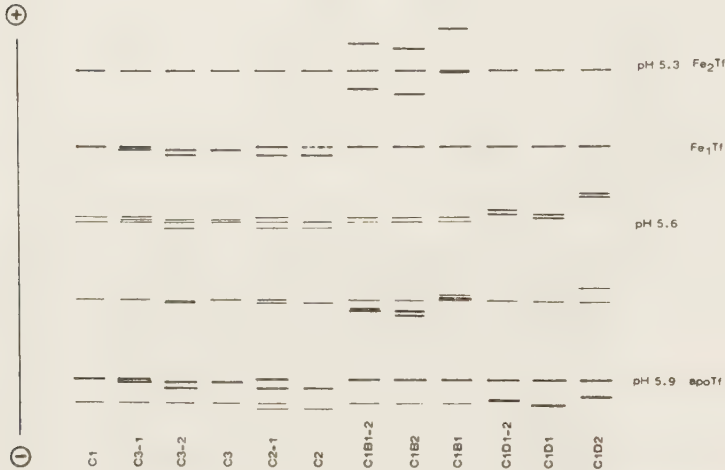
Zur sicheren Identifizierung der Tf-Phänotypen wurde bei einigen Gelen unmittelbar nach der isoelektrischen Fokussierung eine Immunfixation durchgeführt (Abb. 21a-c). Dazu wurde ein monospezifisches Anti-Human-Tf-Antiserum von zwei verschiedenen Herstellern (DAKO-Immunglobuline Boehringer, MERZ+DADE Atlantic Antibodies) in einer Verdünnung von 1:5 verwendet. Diese im Immunoprint-Verfahren durchgeführte Reaktion ermöglichte erstmals die vollständige Erfassung des komplexen Tf-Bandenmusters. Die beiden Antisera, von unterschiedlicher Herkunft (Kaninchen, Ziege), ergaben identische Präzipitate. Das komplexe Bandenmuster entspricht dabei den verschiedenen Zustandsformen der Transferrine nach der Eisensättigung (apo-Tf, Fe_1 -Tf, Fe_2 -Tf).

Aus Abb. 21c gehen vergleichsweise die Banden einer unbehandelten Probe (Typ Tf C2-1) neben denen von eisengesättigten Proben hervor. Man erkennt, daß sich ohne Eisenbehandlung keine zusätzlichen Banden in der Typisierungszone von Fe_1 -Tf und Fe_2 -Tf immunologisch nachweisen lassen.

Die Anwendung der Immunfixation erlaubt zudem eine sichere Differenzierung der Tf-Phänotypen. In unserem Untersuchungsmaterial wurde mit dieser verbesserten Methode eine weitere seltene genetische Variante gefunden. Diese neue, vorläufig als Tf Bx bezeichnete Variante, besitzt ein ähnliches Bandenmuster wie Tf B2. Sie läßt sich mit der normalen Agarosegel-Elektrophorese kaum von Tf B2 und Tf B1-2 unterscheiden. Die Tf B1-Variante weist dagegen einen ähnlichen isoelektrischen Punkt wie Tf C1 auf. Nach der Immunfixation zeigt sie allerdings eine etwas kräftigere kathodale und schwächere anodale Bande im Fe_2 -Tf-Bereich (Abb. 21b und c). Die beobachteten seltenen Phänotypen wurden mit Referenzproben verglichen, die mir Herr Dr. Kühnl vom Institut für Immunhämatologie, Universität Frankfurt, freundlicherweise zur Verfügung stellte.

Wegen der Ähnlichkeit einzelner Phänotypen sollte man vorläufig die Agarosegel-Elektrophorese noch parallel zur PAGIF durchführen, um eine sichere Erfassung sämtlicher Tf-Varianten zu gewährleisten.

Abb. 22 Schematische Darstellung der beobachteten Tf-Phänotypen nach der PAGIF-Immunfixations-Methode

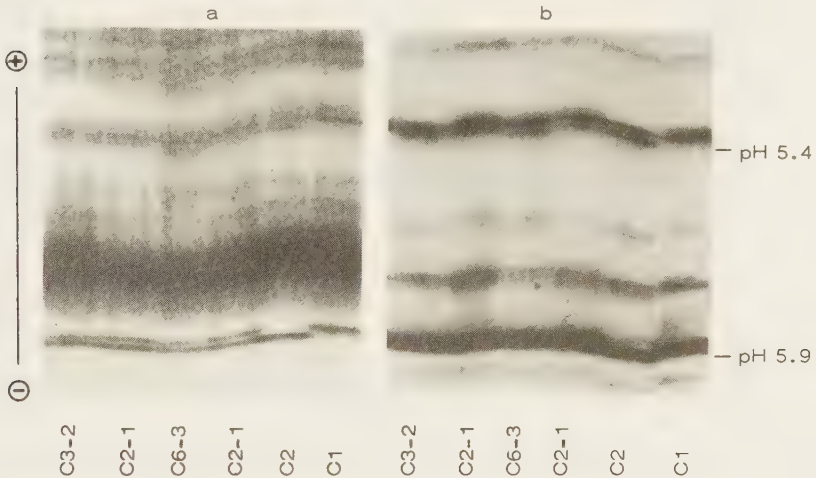


Zur besseren Unterscheidung sind die Bandenmuster der beobachteten Tf-Phänotypen in Abb. 22 noch einmal schematisch dargestellt. Die erst kürzlich in unserem Laboratorium gefundenen Varianten Tf Bx und Tf D3 müssen noch mit weiteren Standardseren verglichen werden. Sie sind deshalb in dieser Darstellung nicht enthalten. Für die Klassifizierung der Tf C-Untergruppen ist sowohl der $\text{Fe}_1\text{-Tf}$ - als auch der apo-Tf-Bereich von Bedeutung. Eine sichere Differenzierung der 6 häufigen Tf C-Subtypen ist allerdings nur in der $\text{Fe}_1\text{-Tf}$ -Zone unter Einbeziehung der apo-Tf-Banden möglich.

Bei den Routineuntersuchungen ergab sich kürzlich ein Hinweis für die Existenz eines weiteren Tf C-Subtypenalleles. Abb. 23 zeigt den gefundenen Subtyp Tf C6-3 neben Tf C2-1 nach der Coomassie Blau-Färbung und Immunfixation. Das neue Allelprodukt Tf C6 ließ sich nach mehreren Wiederholungen nur in der $\text{Fe}_1\text{-Tf}$ -Typisierungszone (pH 5.4) von Tf C2 unterscheiden. Ein Vergleich mit der Referenzprobe Tf C7-1, die mir Herr Dr. Kühnl freundlicherweise zur Verfügung stellte, ergab für Tf C6 eine intermediäre Position zwischen Tf C2 und Tf C7. Es sei bemerkt, daß sich die seltenen Typen Tf C6-3

und Tf C7-1 in der konventionellen Agarosegel-Elektrophorese vom normalen Tf C-Typ nicht unterscheiden ließen.

Abb. 23 Tf C-Subtypen nach der Coomassie-Färbung (a) und Immunfixation (b)



Über die Existenz zweier weiterer Subtypenallele, Tf C4 und Tf C5, deren Genprodukte anodal zu Tf C1 bzw. intermediär zu Tf C2 und C3 liegen, wurde ebenfalls in jüngster Zeit berichtet (CONSTANS et al., 1980). Das Vorkommen eines sechsten und siebten Allels hielten die Autoren für sehr wahrscheinlich. Für die bislang bekannten Tf C-Subtypen ergibt sich damit von der Anode in Richtung Kathode folgende Sequenz: Tf C4 > C1 > C3 > C5 > C2 > C6 > C7. Diese mittlerweile etwas verwirrende numerische Reihenfolge läßt eine Reform der Nomenklatur wünschenswert erscheinen.

3.2. Untersuchungen zur Populationsgenetik

3.2.1. Phänotypenverteilung und Allelenhäufigkeit

Zur Genetik des erweiterten Tf-Polymorphismus wurden zwei voneinander unabhängige Stichprobenuntersuchungen in Süddeutschland durchgeführt. Die überwiegend aus blutgruppengenetischen Untersuchungen stammenden Sera wurden mir von Herrn Prof. Schwarzfischer dankenswerterweise zur Verfügung gestellt.

Tab. 12 A. Verteilung der Tf-Phänotypen und Allelfrequenzen in einer Stichprobe aus Süddeutschland. Es wurden 3 häufige Tf C-Subtypen bestimmt.

Phänotypen	Beobachtet		Erwartet		Allel- frequenzen
	n	%	n	%	
Tf C1	330	73.33	328.50	73.00	$Tf^{C1} = 0.8544$
C2-1	101	22.44	105.12	23.36	$Tf^{C2} = 0.1367$
C2	11	2.45	8.41	1.88	$Tf^{B1} = 0.0011$
C1 B1	1	0.22	1.27	0.28	$Tf^{B2} = 0.0045$
C1 B1-2	2	0.45	1.73	0.38	$Tf^{B1-2} = 0.0022$
C1 B2	4	0.89	4.55	1.01	$Tf^{D1} = 0.0011$
C1 D1	1	0.22	0.42	0.09	
Summe	450	100.00	450.00	100.00	

$$\sum \chi^2 = 1.9326; \text{ df} = 1; P > 0.20$$

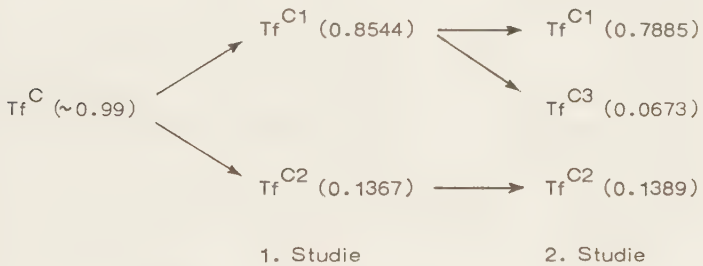
Tab. 12 B. Verteilung der Tf-Phänotypen und Allelfrequenzen in einer Stichprobe aus Süddeutschland. Es wurden 6 häufige Tf C-Subtypen bestimmt.

Phänotypen	Beobachtet		Erwartet		Allel- frequenzen
	n	%	n	%	
Tf C1	350	62.72	346.93	62.25	$Tf^{C1} = 0.7885$
C2-1	118	21.14	122.23	21.93	$Tf^{C2} = 0.1389$
C2	12	2.15	10.77	1.93	$Tf^{C3} = 0.0673$
C3-1	57	10.22	59.22	10.63	$Tf^{B2} = 0.0035$
C3-2	12	2.15	10.43	1.87	$Tf^{B1-2} = 0.0018$
C3	3	0.54	2.53	0.45	
C1 B2	3	0.54	3.08	0.55	
C2 B2	1	0.18	0.54	0.11	
C1 B1-2	2	0.36	1.58	0.28	
Summe	558	100.00	557.31	100.00	

$$\sum \chi^2 = 1.2262; \text{ df} = 3; P > 0.20$$

Die Tab. 12 A und 12 B zeigen das Ergebnis unserer Stichprobenuntersuchungen im süddeutschen Raum. In der ersten Studie wurden drei, und in der zweiten Studie sechs häufige Tf C-Subtypen bestimmt. Die beiden untersuchten Populationen zeigen eine gute Übereinstimmung zwischen den beobachteten und erwarteten Werten. Der Vergleich der Tf^{C1}-Allelenhäufigkeit läßt erkennen, daß das Subtypenallel Tf^{C3} wahrscheinlich aus einer Aufspaltung von Tf^{C1} resultiert, da die Summe aus Tf^{C1} (0.7885) und Tf^{C3} (0.0673) etwa der Tf^{C1}-Allelfrequenz (0.8544) unserer ersten Studie entspricht. Für das Subtypenallel Tf^{C2} ergibt sich in beiden Kollektiven ein ähnlicher Wert.

Aufspaltung des Tf^C-Allels:



Durch die günstige Verteilung der Subtypen steht mit Tf ein äußerst informatives Mehrallelensystem für human- und populationsgenetische Fragestellungen zur Verfügung.

3.2.2. Vergleich mit anderen Populationen

Zur Häufigkeitsverteilung der Tf C-Subtypen liegen inzwischen mehrere Untersuchungen an verschiedenen menschlichen Populationen vor. In Tab. 13 sind die Allelfrequenzen von einigen europäischen, afrikanischen und asiatischen Populationen zusammengestellt.

Tab. 13 Vergleich bisheriger populationsgenetischer Daten

Populationen	n	Allelfrequenzen			
		Tf ^{C1}	Tf ^{C2}	Tf ^{C3}	Tf ^{Var}
Hessen (Kühnl u. Spielmann, 1978 _a)	942	0.8195	0.1720	-	0.0085
Hessen (Kühnl u. Spielmann, 1979)	252	0.7950	0.1550	0.0420	0.0080
Berlin (Martin, 1979 _a)	121	0.7900	0.2100	-	-
Hamburg (Janssen et al., 1981)	896	0.8400	0.1600	-	-
Süddeutschland (Weidinger et al., 1980)	450	0.8544	0.1367	-	0.0089
	184	0.7772	0.1468	0.0706	0.0054
Süddeutschland (Eigene Untersuchung)	558	0.7885	0.1389	0.0673	0.0053
Dänemark (Thymann, 1978)	132	0.8144	0.1856	-	-
Belgien (Hoste, 1979)	253	0.7840	0.2060	-	0.0100
Schweden (Stibler et al., 1979)					
Stockholm	100	0.9050	0.0900	-	0.0050
Umea	100	0.8400	0.1550	-	0.0050
Lappen	100	0.8300	0.1650	-	0.0050
Pyrenäen (Constans et al., 1980)	250	0.7880	0.1320	0.0530	0.0270
Pygmäen Bi-Aka (Constans et al., 1981)	337	0.8200	0.0270	-	0.1530
Indien (Walter et al., 1981)					
Südindien	341	0.6980	0.2519	0.0101	0.0400
Nordindien	394	0.7190	0.2507	0.0264	0.0390

Tab. 13 zeigt, daß das Tf^{C1} -Allel in den bislang untersuchten Populationen weitaus am häufigsten vorkommt. Innerhalb der deutschen Stichproben decken sich unsere Untersuchungsergebnisse mit denen von KUEHNLE u. SPIELMANN (1979) in Hessen sowie JANSSEN et al. (1981) in Hamburg. Die Berliner Stichprobe zeigt demgegenüber eine deutlich höhere Tf^{C2} -Allelfrequenz. Ein etwas höherer Tf^{C2} -Wert wurde auch von KUEHNLE u. SPIELMANN (1978_a) noch in der ersten hessischen Bevölkerungsstichprobe gefunden. Im Vergleich zu fremdrassischen Populationen ist das Tf^{C2} -Allel bei europäischen Bevölkerungsgruppen weniger weit verbreitet. Über Tf^{C3} gibt es bislang nur wenige Daten. Für Hessen und Süddeutschland wurden Werte zwischen 0.04 und 0.07 ermittelt. Die Diskrepanz in der Allelenhäufigkeit bei den deutschen Stichproben läßt sich vermutlich auf die noch relativ geringe Zahl der Untersuchungen sowie auf eventuelle Typisierungsfehler, die sich aufgrund der schwierigen Darstellung ergeben, zurückführen. Gegenüber außereuropäischen Populationen lassen sich deutliche Unterschiede erkennen. Um über die geographische bzw. rassische Verteilungsheterogenität der Tf -Allelfrequenzen eine genaue Aussage zu treffen, bedarf es noch umfangreicher populationsgenetischer Untersuchungen.

3.3. Familienuntersuchungen

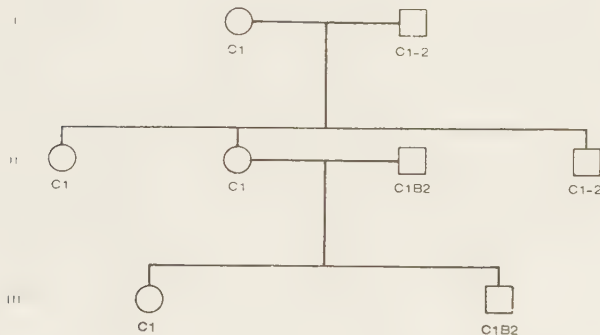
Die Segregation der Kinderphänotypen wurde bei 110 Elternpaaren mit insgesamt 110 Kindern verfolgt (Tab. 14). Hier handelte es sich vorwiegend um sogenannte "sichere Gutachtenfamilien", bei denen nur ein Kind zur blutgruppenserologischen Untersuchung kam. Bei den insgesamt 14 verschiedenen elterlichen Phänotypenkonstellationen ergab sich keine Abweichung vom angenommenen autosomal kodominanten Erbgang. Die Beobachtungs- und Erwartungswerte stimmen dabei gut überein. Eine entgegengesetzte Reinerbigkeit, die uns eventuell einen Hinweis für das Vorkommen einer 'stummen' Information im Tf -System hätte liefern können, wurde in keiner Mutter-Kind-Verbindung vorgefunden. Bei den Untersuchungen wurde auch kein abweichender Tf -Phänotyp, bei dem drei oder mehr Allelprodukte zugleich vorkamen, beobachtet.

Tab. 14 Verteilung der Tf-Phänotypen in 110 Familien mit insgesamt 110 Kindern

Eltern		n	Kinder						
			C1	C2-1	C2	C3-1	C3-2	C3	C1B2
C1	x C1	50	50 (50)	-	-	-	-	-	-
C1	x C2-1	26	14 (13)	12 (13)	-	-	-	-	-
C1	x C2	2	-	2 (2)	-	-	-	-	-
C1	x C3-1	13	6 (6.5)	-	-	7 (6.5)	-	-	-
C1	x C3-2	3	-	1 (1.5)	-	2 (1.5)	-	-	-
C1	x C3	1	-	-	-	1 (1)	-	-	-
C2-1	x C2-1	6	1 (1.5)	3 (3)	2 (1.5)	-	-	-	-
C2-1	x C2	1	-	1 (0.5)	0 (0.5)	-	-	-	-
C2-1	x C3-1	3	1 (0.75)	0 (0.75)	-	0 (0.75)	2 (0.75)	-	-
C2-1	x C3-2	1	-	1 (0.25)	0 (0.25)	0 (0.25)	0 (0.25)	-	-
C2	x C3-1	1	-	1 (0.5)	-	-	0 (0.5)	-	-
C3-1	x C3-2	1	-	0 (0.25)	-	0 (0.25)	1 (0.25)	0 (0.25)	-
C3-1	x C3	1	-	-	-	0 (0.5)	-	1 (0.5)	-
C1	x C1 B2	1	1 (0.5)	-	-	-	-	-	0 (0.5)
Summe		110	73	21	2	10	3	1	0

Die Erwartungswerte stehen in Klammern.

Abb. 24 Erbgang der Tf-Genotypen über drei Generationen



In der Familie SA wurde der Erbgang der Tf-Genotypen über drei Generationen verfolgt (Abb. 24). Dabei konnten wir keine Ausnahme von der Erbregel feststellen. Die Anlage für die seltene Tf B2-Variante erbte in diesem Fall der Sohn von seinem biologischen Vater aus der 2. Generation.

Zusammen mit den Untersuchungen von KUEHNLE u. SPIELMANN (1978_a, 1979_a) KUEHNLE et al. (1979); MARTIN (1979) und JANSSEN et al. (1981) addiert sich das bisherige Familienmaterial auf 912 Erbgänge; hierunter finden sich 392 sog. kritische Mutter/Kind-Paare. Damit dürfte die Hypothese von zwei bzw. drei häufigen Tf^C-Subtypenallelen seine volle Gültigkeit erlangen.

3.4. Anwendung in der forensischen Serologie

Die Feststellung der Vaterschaft ist für ein nichteheliches Kind von erheblicher Bedeutung, da nach dem Nichtehelichengesetz ein solches Kind seinen Unterhaltsanspruch gegen den Vater erst dann verwirklichen kann, wenn dessen Vaterschaft festgestellt ist. Kommt keine freiwillige Anerkennung der Vaterschaft zustande, erhebt das Kind bzw. in praxi das zuständige Jugendamt Klage auf Feststellung der Paternität. Eines der wichtigsten Beweismittel dafür ist das

blutgruppen-serologische Gutachten, in welches das Kind, die Kindesmutter, der 'fragliche Vater' und eventuelle Mehrverkehrer einbezogen werden.

Das Tf-System wurde schon früher, d.h. vor der Ära der Isoelektrofokussierung, von zahlreichen Laboratorien in die Vaterschaftsbegutachtung einbezogen. Wegen der ungünstigen Verteilung der Phänotypen (Häufigkeit von Tf C ca. 99 %) hatte es für die forensische Begutachtung allerdings nur eine geringe Bedeutung. Die Untersuchungen konzentrierten sich wegen der Möglichkeit eines positiven Hinweises vor allem auf die zahlreichen Varianten Tf B und D, deren Gesamthäufigkeit bei Europäern mit durchschnittlich etwa 1 % angegeben wird. Durch die Elektrofokussierung erhält dieses System eine wesentlich größere Aussagekraft, da die darstellbaren Tf C-Subtypen in unserer Bevölkerung günstig verteilt sind.

Tab. 15 Ausschlüsse im Transferrin-System

Untersuchte Fälle	n	Ausschlüsse			Summe
		Kläger	Beklagte	Zeugen	
Ein-Mann-Fälle	172	1	2	0	3
Zwei-Mann-Fälle	56	3	4	3	10
Drei-Mann-Fälle	10	1	0	2	3
Vier-Mann-Fälle	3	0	1	6	7
Summe	241	5	7	11	23

Ein Vaterschaftsausschluß liegt vor, wenn der Eventualvater ein bestimmtes Merkmal nicht besitzt, welches das Kind nach der vorliegenden Mutter-Kind-Konstellation von seinem Vater geerbt haben muß. Aus Tab. 15 gehen die gefundenen Ausschlüsse im Tf-System hervor. Durch Anwendung der Subtypisierung wurden in 241 untersuchten Ein- und Mehr-Mann-Fällen insgesamt 5 Kläger, 7 Beklagte und 11 Zeugen als Nichtväter von der angeblichen Vaterschaft ausgeschlossen. Die Ausschlüsse decken sich denen in anderen Systemen (siehe S. 57). Eine Ausnahme bildet ein Zwei-Mann-Fall (81/80), in dem nur ein

Ausschluß im Tf-System festgestellt wurde, ohne daß sich gleichzeitig in den übrigen untersuchten Systemen ebenfalls ein Widerspruch zur Erbregel ergab. Im vorliegenden Fall (Kind = Tf C2-2, Mutter = Tf C2-1, Beklagter = Tf C3-1, Zeuge = Tf C2-1) wurde der Beklagte von der angeblichen Vaterschaft ausgeschlossen, weil die Anlage für das Merkmal Tf C2, welche das Kind im homozygoten Zustand besitzt, bei ihm fehlte. Die Wiederholung mit frischen Blutproben führte zu dem selben Ergebnis. Mit der Untersuchung von 24 weiteren Blut-, Serum- und Enzym-gruppensystemen konnten wir gleichzeitig die Vaterschaft des Zeugen (W-Wert $\hat{=}$ 99.8 %) 'praktisch erweisen'.

Für das erweiterte Tf-System errechnet sich aufgrund der Häufigkeit der einzelnen Gene in unserer Bevölkerung eine theoretische Ausschlußwahrscheinlichkeit von 18.7 %. Die praktische Ausschlußchance beträgt 9.5 %. Hinweise auf mögliche lagerungsbedingte Veränderungen, die zu einer Fehltypisierung führen könnten, wurden nicht gefunden. Die gute Lagerungsstabilität und günstige Allelenverteilung erhöhen die Bedeutung dieses Systems in der Vaterschaftsbegutachtung.

4. Pi - Subtypisierung

4.1. Identifizierung und Differenzierung der Phänotypen

Zur Darstellung der Phänotypen des Proteaseinhibitors (Pi) α_1 -Antitrypsin haben wir normalerweise frische Humansera verwendet. In einigen Fällen mußten aber auch ältere Sera und nicht-heparinisierte Plasmaproben zur Untersuchung herangezogen werden. Die Analyse erfolgte mittels der Flachbett-Isoelektrofokussierung auf Polyacrylamidgelen (PAGIF).

Abb. 25 Pi-Phänotypen nach der Isoelektrofokussierung (PAGIF, pH 4-5)

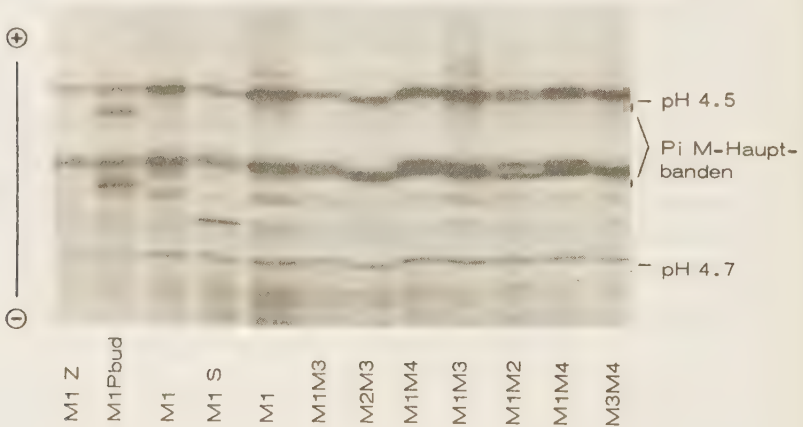
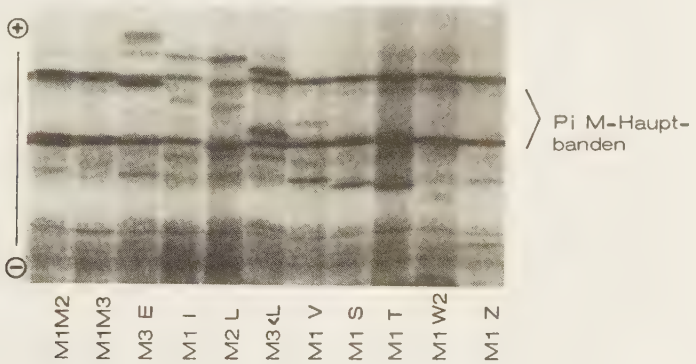


Abb. 25 zeigt die Bandenmuster von neun verschiedenen Pi-Phänotypen aus Humansera nach der PAGIF in dem sehr engen pH-Bereich von 4-5. Die Mikroheterogenität von α_1 -Antitrypsin (α_1 -AT) äußert sich dabei in zwei stärker und drei schwächer ausgeprägten Fraktionen mit isoelektrischen Punkten zwischen pH 4.4 und 4.7. Mit Hilfe der Immunfixation wurde sichergestellt, daß es sich bei den Banden im sauren pH-Bereich auch tatsächlich um α_1 -AT handelt. Zudem haben wir mehrere funktionelle Tests durchgeführt. So ließen sich beispielsweise mit einem Überschuß an Trypsin in den Analysenproben, die α_1 -AT-Fractionen aus den sie erwarteten Positionen eliminieren. Eine Neuraminidasebehandlung (Sigma Typ V N2876) führte bei den M-, S- und Z-Proteinen zu einer identischen Veränderung des Mikroheterogenitätsmusters.

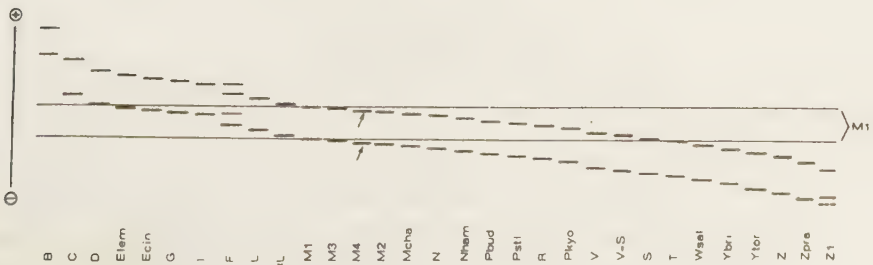
Die Benennung der Phänotypen erfolgte nach den Empfehlungen des Internationalen Pi-Komitees von Rouen, Frankreich 1978. Der Nomenklatur entsprechend sind die Pi-Varianten nach ihren Positionen im Trenngel mit Buchstaben gekennzeichnet.

Abb. 26 Pi-Phänotypen nach PAGIF und Coomassie Blau-Färbung



In Abb. 26 sind neun verschiedene Pi-Varianten dargestellt. Daneben finden sich zum Vergleich die heterozygoten Subtypen Pi M1M2 und M1M3. Die Varianten Pi E, I, L und <L nehmen dabei eine anodale Position gegenüber den Pi M-Hauptbanden ein. Die Varianten Pi V, S, T, W2 und Z liegen katal davon. Zur Klassifizierung der seltenen Varianten wurden Standards herangezogen, die mir Herr Dr. Kühnl freundlicherweise zur Verfügung stellte.

Abb. 27 Schematische Wiedergabe der beobachteten Pi-Phänotypen



Nach der Herkunft der Varianten bedeutet: Elem = Elemberg, Ecin = Ecin-cinnati, Mcha = Mchapelhill, Nham = Nhampton, Pbud = Pbudapest, Pstl = Pstlouis, Pkyo = Pkyoto, Wsal = Wsalerio (W2), Ybri = Ybrighton, Ytor = Ytoronto und Zpra = Zpratt.

Abb. 27 zeigt die verschiedenen bislang beobachteten Pi-Typen in schematischer Darstellung. Nach der PAGIF besitzen die meisten Varianten der über 30 Pi-Allele ein Zweibandenmuster. Pi F unterscheidet sich durch ein Vierbandenmuster von den Varianten I und L, welche ähnliche isoelektrische Punkte aufweisen. Die Pi M-Untertypen liegen zwischen anodalen (Pi B $\rightarrow$ L) und kathodalen Varianten (Pi Mcha $\rightarrow$ Z). Sie zeigen von der Anode in Richtung Kathode folgende Sequenz: M1 $\rightarrow$ M3 $\rightarrow$ M4 $\rightarrow$ M2. Pfeile kennzeichnen die Position der Banden der zuletzt entdeckten Pi M4-Untergruppe (CONSTANS et al., 1980_a; WEIDINGER 1980).

Abb. 28 Schematische Darstellung der 10 häufigen Pi M-Subtypen (Ausschnitt aus einer der Hauptfraktionen)



Die Mikroheterogenität der Pi M-Untertypen spiegelt sich in zehn Phänotypen wider, wie dies bei vier Pi^M-Allelen zu erwarten ist (WEIDINGER et al., 1982). Abb. 28 zeigt schematisch die zehn häufigen Pi M-Subtypen. Erfahrungsgemäß läßt sich die Subtypisierung am besten in den beiden Hauptfraktionen (M₄ und M₆), bisweilen noch in der kathodalen Zone (M₈) durchführen. Pi M4 nimmt dabei eine intermediäre Position zwischen M2 und M3 ein. Die Existenz

eines fünften Pi^M -Allels, dessen Genprodukte einen nur minimal zu M1 kathodisch liegenden pI -Wert besitzen, wird für wahrscheinlich gehalten. Da sich die Pi M-Typen nur geringfügig in ihren isoelektrischen Punkten ($\Delta pH \sim 0.01$ Einheiten) unterscheiden, ist zu ihrer Erfassung ein sehr enger pH -Gradient erforderlich. Auf die Bedeutung einer sicheren Typisierung der Pi M-Individuen wird später im Rahmen der Paternitätsbegutachtung eingegangen.

Abb. 29 Densitogramme der Pi -Untertypen M1M3 und M1M4

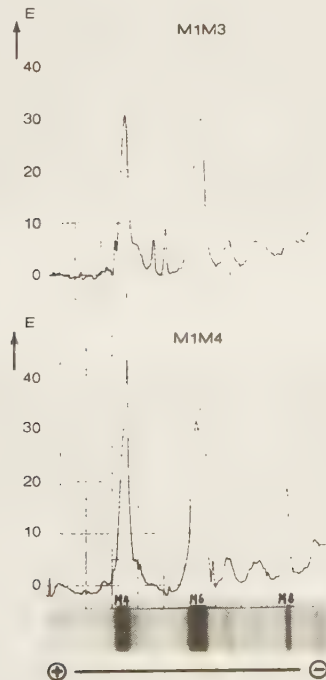
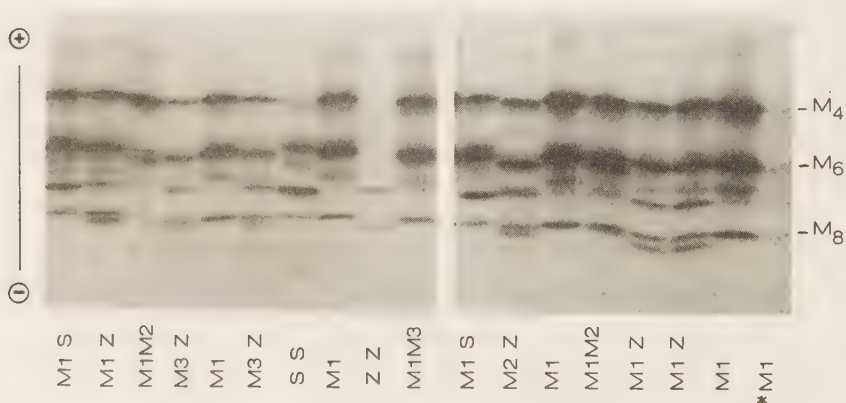


Abb. 29 präsentiert die Absorptionsverteilungskurven von zwei ähnlichen, in der Praxis manchmal schwer zu unterscheidenden Pi M-Untertypen. Nach dieser Aufzeichnung, die durch einen W+W Recorder in Kombination mit dem Dünnschichtdensitometer TLD 100 bei einer Wellenlänge von 578 nm und einer

Spaltbreite von 0.1 mm erfolgte, lassen die beiden Typen deutliche Unterschiede erkennen. M1M4 zeigt in der M_6 -Zone zwei 'peaks' unterschiedlicher Intensität, während M1M3 nur einen 'peak' mit einer asymmetrischen Schulter aufweist. Die ausgezeichnete M1M4-Intensitätsverteilungskurve entspricht hier dem darunterliegenden Pi-Muster. Durch die Densitometrie läßt sich somit in schwierigen Fällen eine genauere Aussage treffen.

Abb. 30 Pi-Phänotypen nach der Isoelektrofokussierung und Immunfixation

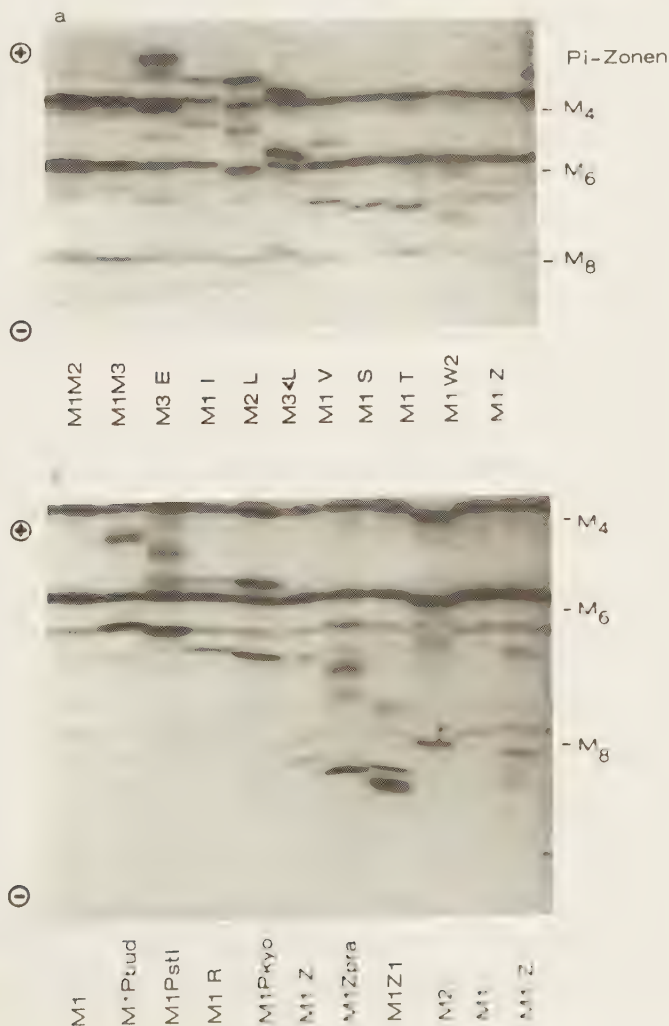


Zur Pi-Klassifizierung wurde bei einigen Gelen eine Immunfixation durchgeführt (Abb. 30). Wir verwendeten dazu monospezifische Anti-Human- α_1 AT-Antisera von Kaninchen (DAKO-Immunglobuline Boehringer Nr. 10-012) und Ziegen (MERZ+DADE Atlantic Antibodies Nr. 003-03). Bei der Typisierung im sehr engen pH-Bereich von 4-5 war eine Verdünnung der Antisera im Verhältnis 1:3 mit physiologischer NaCl-Lösung erforderlich, da sich ansonsten ein starker Antikörperüberschuß störend bemerkbar machte. Dies äußerte sich in einer zentralen Aufhellung der fixierten Antigen-Antikörperkomplexe. Durch die Immunfixation konnten wir eine Interferenz der Pi-Banden mit einem anderen schon bekannten Polymorphismus der α_1 -Region (z.B. Haptoglobine) praktisch ausschließen.

* Pi-Phänotyp aus dialysierter Amnionflüssigkeit. Diese Probe wurde mir von Herrn Prof.Dr.Cleve freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Abb. 30 zeigt heterozygote und homozygote Träger des Defektalleles Pi^Z im Vergleich mit M- und S-Typen. Zugleich ließ sich aus einer dialysierten Amnionflüssigkeit der homozygote Typ M1 nachweisen. Auf die sichere Erfassung der verschiedenen Pi -Defizienzformen und deren zunehmende klinische Bedeutung wird später im Abschnitt 4.4.2. eingegangen.

Abb. 31 Demonstration seltener Pi -Phänotypen nach der Immunfixation



In den Abbildungen 31a und b sind verschiedene seltene Pi-Typen im Vergleich zu MS- und MZ-Typen nach der PAGIF-Immunfixation (Immunoprint-Technik) dargestellt. Durch Zugabe einer Trennschicht (z.B. 0.02 M ACES = N-(2-Acetamido)-2-aminoäthansulfonsäure) ließ sich mit der Dünnschicht-Isoelektrofokussierung eine optimale Trennung der Banden in der M_8 -Zone erzielen, ohne daß damit gleichzeitig die M-Banden in den Pi-Hauptzonen (M_4 und M_6) weiter getrennt wurden.

Bei unseren Untersuchungen ließen sich die seltenen beobachteten Varianten Pi E, I, L, κ L, V, T und Pbud mit Hilfe der Immunfixation bestätigen. Die Varianten Pi W2, PstI, R, Pkyo und Zpra dienten als Standards. Auf die Existenz einer neuen seltenen Variante, welche eine Z-ähnliche Position aufweist, wurde durch unsere Untersuchungen erstmals hingewiesen (WEIDINGER et al., 1980_b). Diese vorläufig als Pi Z1 bezeichnete Mutante besitzt ein ähnlich komplexes Bandenmuster wie Zpra, deren Banden ebenfalls kathodal zu Pi Z liegen. Als Mangelmutante zeigt Pi Z in der Regel wesentlich schwächere Banden als die übrigen Varianten im Pi-System. Man kann sie deshalb auf gefärbten Gelen schwer erkennen und unter Umständen übersehen.

Untersuchungen zur Lagerungsstabilität ließen erkennen, daß sich die Bandenmuster der Pi-Typen bei zu häufigem Einfrieren und Auftauen verändern. Dabei verschwinden zunächst die relativ schwachen Banden des Z-Typs. Ein MZ-Heterozygoter könnte dann fälschlicherweise als M-Homozygoter angesprochen werden. Außerdem können bei der Typisierung älterer Proben eventuell artefizielle, lagerungsbedingte Veränderungen auftreten. Mit Hilfe der Immunfixation war es möglich, in mehreren Fällen fragliche Pi-Typen noch sicher zu identifizieren, so daß sich eine Nachuntersuchung mit frischem Material erübrigte.

4.2. Untersuchungen zur Populationsgenetik

4.2.1. Verteilung der Pi-Phänotypen und Allelfrequenzen

Die folgenden Tabellen zeigen die Verteilung der Pi-Phänotypen von zwei untersuchten Kollektiven aus dem süddeutschen Raum. In der ersten Bevölkerungsstichprobe wurde bei insgesamt 347 nichtverwandten Personen die

Tab. 16 A. Pi-Phänotypenverteilung und Allelfrequenzen in der süddeutschen Bevölkerung. In dieser Stichprobe wurden 6 häufige Pi M-Subtypen bestimmt.

Phänotypen	Beobachtet		Erwartet		Allel- frequenzen
	n	%	n	%	
Pi M1	171	49.28	166.02	47.84	$P_i^{M1} = 0.6917$
M1M2	79	22.77	80.93	23.32	$P_i^{M2} = 0.1686$
M2	9	2.59	9.86	2.84	$P_i^{M3} = 0.0865$
M1M3	35	10.09	41.52	11.97	$P_i^S = 0.0230$
M2M3	13	3.75	10.12	2.92	$P_i^Z = 0.0187$
M3	3	0.86	2.60	0.75	$P_i^* = 0.0115$
M1 S	9	2.59	11.04	3.18	
M2 S	4	1.15	2.69	0.78	
M3 S	3	0.86	1.38	0.40	
M1 Z	10	2.88	8.98	2.59	
M2 Z	1	0.29	2.19	0.63	
M3 Z	2	0.58	1.12	0.32	
M3 F	1	2.31	8.55	2.46	
M1 I	1				
M2 I	1				
M1 L	1				
M2 L	1				
M1 T	1				
M1 Z1	2				
Summe	347	100.00	347.00	100.00	

$$\sum \chi^2 = 2.3037; \text{ df} = 5; P > 0.20$$

P_i^* = Häufigkeit der seltenen Pi-Allele

Die Phänotypen von P_i^S , P_i^Z und P_i^* mit $n < 5$ wurden zur χ^2 -Berechnung zusammengefaßt.

Tab. 16 B. Pi-Phänotypenverteilung und Allelfrequenzen in der süddeutschen Bevölkerung. In dieser Stichprobe wurden 10 häufige Pi M-Subtypen bestimmt.

Phänotypen	Beobachtet		Erwartet		Allel- frequenzen
	n	%	n	%	
Pi _i M1	184	47.92	182.93	47.64	Pi ^{M1} = 0.6902
M1M2	90	23.44	90.43	23.55	Pi ^{M2} = 0.1706
M2	10	2.60	11.18	2.91	Pi ^{M3} = 0.0808
M1M3	40	10.42	42.82	11.15	Pi ^{M4} = 0.0183
M2M3	13	3.39	10.59	2.76	Pi ^S = 0.0182
M3	3	0.78	2.51	0.65	Pi ^Z = 0.0143
M1M4	10	2.61	9.70	2.53	Pi [*] = 0.0076
M2M4	2	0.52	2.40	0.63	
M3M4	1	0.26	1.14	0.30	
M1 S	11	2.86	9.65	2.51	
M2 S	3	0.78	2.38	0.62	
M1 Z	7	1.82	7.58	1.97	
M2 Z	2	0.52	1.87	0.49	
M3 Z	1	0.26	0.89	0.23	
M4 Z	1	0.26	0.20	0.05	
M3 F	1	1.56	7.73	2.01	
M1 I	1				
M1 L	1				
M2 L	1				
M1 Z1	1				
M1 Z2	1				
Summe	384	100.00	384.00	100.00	

$$\sum \chi^2 = 1.0719 ; df = 5 ; P > 0.20$$

Pi^{*} = Häufigkeit der seltenen Pi-Allele

Verteilung von drei Pi^M -Subtypenallelen überprüft. Dabei konnten wir außer den 6 häufigen Pi^M -Untertypen, 16 MS- und 13 MZ-Typen beobachten; zudem wurden 6 seltene Pi -Varianten im heterozygoten Zustand gefunden. Beobachtungs- und Erwartungswerte stimmen nach den Bedingungen des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts gut überein. Die Summe der Frequenzen der drei Subtypenallele ($Pi^{M1} = 0.6917$, $Pi^{M2} = 0.1686$, $Pi^{M3} = 0.0865$) beträgt 0.9468. Gegenüber den nächsthäufigeren Allelen Pi^S (0.0230) und Pi^Z (0.0187) erreichen die seltenen Allele im Pi -System nur insgesamt einen Wert von etwa 1%. Die seltenen Phänotypen wurden vor der endgültigen Klassifizierung mit Standards verglichen. Um eventuelle Fehler beim Ablesen zu vermeiden, erfolgte die Identifizierung noch durch einen zweiten Betrachter.

Im Rahmen der Paternitätsbegutachtung zeigte sich, daß bei einer der Proben eine neue seltene Variante vorlag. Diese als Z1 bezeichnete Pi -Variante wurde im Untersuchungsfall M.G./M.W. (29.11.79) zuerst beim Eventualvater und später dann auch bei dessen Kind gefunden. In der Routine konnten wir dieselbe Variante noch einmal bei einer anderen nichtverwandten Person beobachten. Mit Pi^{Z1} ergibt sich wahrscheinlich ein weiteres seltenes Allel im hochpolymorphen Pi -System. Eine Anerkennung durch das Internationale Pi -Komitee steht noch aus.

Nach der Entdeckung eines vierten Pi^M -Subtypenallels (CONSTANS et al. 1980_a; WEIDINGER 1980) wurde eine weitere Stichprobenuntersuchung durchgeführt (Tab. 16 B). In einem Kollektiv von 384 nichtverwandten Personen konnten wir dabei 9 verschiedene Pi^M -Untertypen beobachten. Neben Pi^S und Z wurden die seltenen Varianten F, I, L, Z1 und 'Z2' (siehe Abschnitt 4.4.2) im heterozygoten Zustand angetroffen. Auch in dieser Studie waren die Bedingungen des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts erfüllt, wobei jeweils Phänotypen mit Erwartungswerten von $n < 5$ zur χ^2 -Berechnung zusammengefaßt wurden. Die Allelfrequenzen der beiden untersuchten Kollektive lassen eine gute Übereinstimmung erkennen. Die Summe der vier Pi^M -Subtypenallele ($Pi^{M1} = 0.6902$, $Pi^{M2} = 0.1706$, $Pi^{M3} = 0.0808$, $Pi^{M4} = 0.0183$) beträgt hier 0.9599. Nach den vorliegenden Ergebnissen ergibt sich für Pi^S eine Allelhäufigkeit zwischen 0.018 und 0.023; für Pi^Z eine solche zwischen 0.014 und 0.018. Die kombinierte

Häufigkeit der seltenen Pi-Allele liegt zwischen 0.007 und 0.011. Mit der Entdeckung von Pi^{M4} kennen wir nun 6 Allele mit einer Frequenz >0.01 . Das Pi-System wird damit hinsichtlich der Zahl polymorpher Allele nur noch vom HLA-, Rh- und Gc-System übertroffen.

4.2.2. Populationsgenetischer Vergleich der Allelhäufigkeiten

Vor Einführung der Subtypisierung war für das Pi^M -Allel eine Frequenz von über 0.90 in der mitteleuropäischen Bevölkerung bekannt. Mit der Verfügbarkeit von ampholinen Trägerampholyten mit engen bzw. sehr engen pH-Bereichen und einer verbesserten Fokussiertechnik gelang im Pi-System 1976 die Identifizierung von zwei Pi^M -Subtypenallelen (KUEPPERS 1976; van der BROEK et al. 1976; FRANTS u. ERIKSSON 1976; JEPSSON 1977) und ein Jahr später die Identifizierung von drei Pi^M -Subtypenallelen (KLAUSEN et al. 1977; GENZ et al. 1977). 1980 konnte ich gleichzeitig mit CONSTANS et al. auf die Existenz eines vierten Pi^M -Allels hinweisen.

Tab. 17 zeigt die Verteilung der Pi-Allelfrequenzen in verschiedenen europäischen und außereuropäischen Populationen. In allen untersuchten Bevölkerungen ist Pi^M das häufigste Allel. Das am weitesten verbreitete Subtypenallel Pi^{M1} erreicht bei Europiden mit 0.790 in Finnland seinen höchsten und mit 0.626 in Toulouse (Frankreich) seinen niedrigsten Wert. Für Pi^{M2} liegt die Allelhäufigkeit zwischen 0.170 (Süddeutschland) und 0.080 (Finnland); für Pi^{M3} zwischen 0.050 (Niederlande) und 0.120 (Finnland). Eine populationsgenetische Untersuchung unter Berücksichtigung von vier Pi^M -Allelen wurde bislang nur in Toulouse und Süddeutschland durchgeführt. Dabei wurde für Pi^{M4} eine Allelfrequenz von 0.037 bzw. 0.018 errechnet. Eine erweiterte Untersuchung bei 752 Personen aus Süddeutschland (WEIDINGER et al., 1982) führte erst kürzlich zu einem ähnlichen Ergebnis ($Pi^{M4} = 0.0179$). Die nächsthäufigeren Allele, Pi^S und Pi^Z , lassen ebenfalls eine unterschiedliche Verteilungsheterogenität erkennen. Am größten sind die Unterschiede in der Pi^S -Frequenz, die in Toulouse (0.141), in der spanischen (0.112) und portugiesischen Bevölkerungsstichprobe (0.115) am höchsten ist

Tab. 17 P_i - Allelfrequenzen in verschiedenen Populationen

Populationen	n	Allelfrequenzen						
		P_i^{M1}	P_i^{M2}	P_i^{M3}	P_i^{M4}	P_i^S	P_i^Z	P_i^{Var}
München (Genz et al., 1977)	538	0.7500	0.1477	0.0623	-	0.0223	0.0121	0.0056
München	264	0.7633	0.1364	0.0777	-	0.0208	0.0019	0
Marburg (Cleve et al., 1979)	146	0.6815	0.1541	0.1096	-	0.0342	0.0137	0.0068
Süddeutschland (Weidinger et al., 1980) ^a	347	0.6917	0.1686	0.0865	-	0.0230	0.0187	0.0115
Süddeutschland (Eigene Untersuchung)	384	0.6902	0.1706	0.0808	0.0183	0.0182	0.0143	0.0076
Hessen (Kühnl u. Spielmann, 1978) ^b	229	0.7052	0.1638	0.0917	-	0.0240	0.0109	0.0044
Niederlande (Klasen et al., 1977)	708	0.7210	0.1228	0.1124	-	0.0297	0.0049	0.0092
Niederlande	131	0.7481	0.1298	0.0534	-	0.0420	0.0267	0
Finnland (Frants u. Eriksson, 1978)	136	0.7900	0.0800	0.1200	-	0	0.0100	0
Norditalien (Klasen et al., 1978)	202	0.7203	0.1485	0.0819	-	0.0297	0.0099	0.0097
Südtalien (Klasen, 1981)	150	0.7033	0.1700	0.0800	-	0.0267	0.0133	0.0067
Toulouse (Constans et al., 1980) ^a	163	0.6260	0.0920	0.1040	0.0370	0.1410	0	0
Normandie (Charlionet et al., 1981)	1030	0.6675	0.1427	0.1005	-	0.0631	0.0179	0.0083
Südengland (Arnaud et al., 1979)	926	0.7462	0.1177	0.0605	-	0.0475	0.0221	0.0060
USA (Europide)	240	0.6400	0.1900	0.1100	-	0.0420	0.0130	0.0050
USA (Negride) (Kueppers et al., 1978)	304	0.9030	0.0280	0.0540	-	0.0050	0.0030	0.0070
Mali (Negride) (Frants u. Eriksson, 1978)	102	0.9300	0.0200	0.0400	-	0	0.0100	0

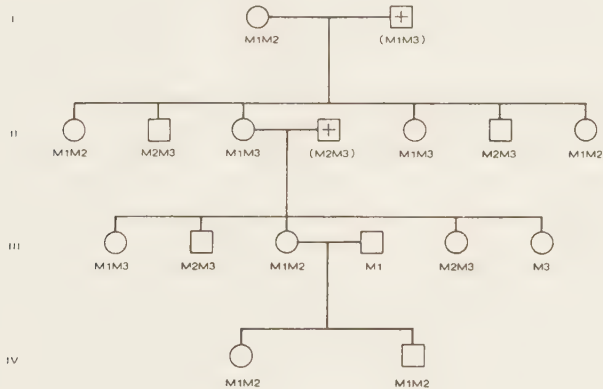
(CONSTANS et al. 1980_a; FAGERHOL u. TENFJORD, 1968; MARTIN et al., 1976) und bei Finnen und Lappen fast fehlt (FRANTS u. ERIKSSON, 1978). Eine relativ hohe Pi^S -Frequenz ergaben auch die populationsgenetischen Untersuchungen von ARNAUD et al. (1979) in Südengland sowie CHARLIONET et al. (1981) in der Normandie. Anhand der bislang vorliegenden Pi^S -Frequenzen könnte man an eine echte ethnische Variabilität im Sinne eines Nordost-Südwest-Trends innerhalb Europas denken, wobei Pi^S in Richtung Süden zunimmt. Für Pi^Z bewegen sich die Werte in Europa zwischen 0 (Toulouse) und 0.0267 (Niederlande). Von einigen Autoren wird angenommen, daß skandinavische Populationen einen höheren Pi^Z -Wert (Schweden: 0.024 ERIKSSON, 1965; Norwegen: 0.0157 FAGERHOL u. LAURELL, 1970) als mitteleuropäische Populationen aufweisen. Betrachtet man jedoch die Untersuchungsergebnisse von KLASSEN et al. (1977) in den Niederlanden sowie WEIDINGER et al. (1980) in Süddeutschland so läßt sich ein Nord-Süd-Trend für Pi^Z nicht bestätigen. Bezüglich der Pi^Z -Verteilung scheinen echte genetische Differenzen zu existieren. Die Frequenz der seltenen Pi -Varianten bewegt sich in den untersuchten Populationen zwischen 0 und 0.0115.

Der Vergleich unserer Daten mit den Untersuchungsergebnissen von KUEHNLE u. SPIELMANN (1978_b) in Hessen läßt eine gute Übereinstimmung in der Pi -Allelenhäufigkeitsverteilung erkennen. Die ersten Untersuchungen von GENZ et al. (1977) und CLEVE et al. (1979) an Münchner Blutspendern weisen noch eine etwas höhere Pi^{M1} - und niedrigere Pi^{M3} -Allelfrequenz auf. Hierfür kommen in erster Linie technische Schwierigkeiten bei der $M1$ - und $M1M3$ -Differenzierung zum Ausdruck. Bezüglich der Pi^M -Subtypenverteilung ergeben sich in der deutschen Bevölkerung keine signifikanten Unterschiede. Eine ähnliche Häufigkeitsverteilung finden wir auch in den Niederlanden und Italien. Andere europäische Populationen oder Populationen europäischen Ursprungs zeigen eine nur leicht abweichende Allelenhäufigkeit. Bei Negriden kommt Pi^{M1} offensichtlich häufiger vor als bei Europiden (KUEPPERS et al., 1978; FRANTS u. ERIKSSON, 1978). Auch scheint das Allel Pi^{M3} eine höhere Frequenz aufzuweisen als Pi^{M2} . Erst die Analyse weiterer Bevölkerungsstichproben an größeren Kollektiven wird eine genauere Aussage über die tatsächliche Verteilung der Allelfrequenzen zu lassen.

4.3. Familienuntersuchungen

Zur Absicherung eines erweiterten formalgenetischen Modells sind umfangreiche Familienuntersuchungen unerlässlich. So zeigten die Untersuchungen von FRANTS u. ERIKSSON (1978); KUEPPERS u. CHRISTOPHERSON (1978); KUEHN u. SPIELMANN (1978_b); CLEVE et al. (1979) sowie WEIDINGER et al. (1980_a), daß drei Pi^M -Allele sechs Pi M-Subtypen determinieren. Der angenommene autosomal kodominante Erbgang von drei Subtypen-allelen im Pi -System ließ sich damit bestätigen.

Abb. 32 Stammbaum der Familie JUR



Bei der Familie JUR haben wir zur Überprüfung des genetischen Modells eine Stammbaumuntersuchung vorgenommen (siehe auch Gc-Subtypisierung S.68). Die Typisierung von insgesamt 15 Familienmitgliedern aus vier Generationen ergab keine Abweichung vom angenommenen Vererbungsmodus. In der Phänotypenverteilung der Geschlechter war kein Unterschied festzustellen. Für die nicht erfaßbaren Väter aus der 1. und 2. Generation dieses Stammbaumes ergeben sich anhand der Aufspaltung die wahrscheinlichen Genotypen M1M3 und M2M3 (in Abb. 32 eingeklammert).

Tab. 18 zeigt die Verteilung der Phänotypen von 136 'sicheren Gutachtenfamilien' aus Süddeutschland, bei denen nur ein Kind zur Untersuchung kam.

Tab. 18 Verteilung der Pj - Phänotypen bei 136 Familien mit insgesamt 136 Kindern

Eltern	Kinder													
	n	M1	M1M2	M2	M1M3	M2M3	M3	M2M4	M1M5	M1S	M2S	M1Z	M2Z	M3I
M1 x M1	33	33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M1 x M2	3	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M1 x M3	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M1 x M1M2	22	10	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M1 x M1M3	12	7	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M1 x M2M3	6	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M1 x M1M4	2	2	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M1 x M2M4	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M1M2 x M1M2	8	3	4	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M1M2 x M2	3	-	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M1M2 x M1M3	7	2	2	-	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-
M1M2 x M2M3	4	-	2	1	0	1	-	-	-	-	-	-	-	-
M1M2 x M3M4	1	-	-	-	0	0	-	1	-	-	-	-	-	-
M1M2 x M1M5	1	0	0	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
M1M3 x M1M3	2	1	-	-	1	-	0	-	-	-	-	-	-	-
M1M3 x M2M3	1	-	1	-	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-
M1 x M1 S	2	0	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-
M1 x M2 S	2	-	0	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-
M2 x M1 S	2	-	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
M1M2 x M1 S	3	0	1	-	-	-	-	-	0	2	-	-	-	-
M1M2 x M2 S	1	-	0	0	-	-	-	-	0	1	-	-	-	-
M1M3 x M2 S	1	-	1	-	0	0	-	-	0	-	-	-	-	-
M1M3 x M3 S	2	-	-	-	0	-	1	-	1	-	-	-	-	-
M1 x M1 Z	3	2	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
M1 x M2 Z	1	-	0	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
M1M2 x M1 Z	4	2	2	-	-	-	-	-	-	0	0	-	-	-
M1M2 x M3 Z	1	-	-	-	0	0	-	-	-	0	1	-	-	-
M1M2 x M4 Z	1	-	-	-	-	-	-	0	-	-	1	-	-	-
M1M3 x M1 Z	1	1	-	-	0	-	-	-	-	-	0	-	-	-
M2M3 x M1 Z	1	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-
M1 x M1 I	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M1 x M1Z1	1	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M1 S x M3 Z	1	-	-	-	0	-	-	-	-	-	0	-	-	1
M3 S x M2 I	1	-	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	1	-
Summe	136	64	34	4	12	3	1	1	1	5	4	3	1	1

Aus dem noch relativ geringen Umfang des Familienmaterials läßt sich bereits die Vielzahl der möglichen Phänotypenkonstellationen erkennen. Bei den Kindern der insgesamt 136 Elternpaare mit 34 verschiedenen Phänotypenkombinationen wurden keine abweichende, den Erbgängen widersprechende Typen gefunden. Die Verteilung der Kinderphänotypen entspricht recht gut den Bedingungen des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts. Die genetischen Varianten I, S, Z und Z1 ließen sich gleichzeitig durch diese Familienuntersuchungen bestätigen. Ein fünftes Pi^M -Allel, dessen Genprodukte wir bei einer Mutter-Kind-Verbindung beobachteten, wird für wahrscheinlich gehalten.

Tab. 19 Verteilung der Pi M4-Typen bei 12 Familien mit insgesamt 14 Kinder

Eltern	n	Kinder					
		M1	M1M2	M1M3	M1M4	M2M4	M1 Z
M1 x M1M4	5	3	-	-	2	-	-
M1 x M2M4	1	-	1	-	1	-	-
M1 x M3M4	1	-	-	1	0	-	-
M1M2 x M1M4	1	0	1	-	0	0	-
M1M2 x M3M4	1	-	-	0	0	1	-
M1M2 x M4 Z	1	-	-	-	0	0	1
M1M3 x M4 S	1	-	-	-	1	-	-
M1 Z x M1M4	1	1	-	-	1	-	0
Summe	12	4	2	1	5	1	1

Der autosomal kodominante Erbgang des vierten Pi^M -Allels ließ sich durch eine erweiterte Familienuntersuchung bestätigen (WEIDINGER et al., 1982). Tab. 19 zeigt die Verteilung der beobachteten Kinderphänotypen von 12 Familien. Bei 8 verschiedenen Phänotypenkonstellationen war immer nur ein Elternteil heterozygoter Träger für die Anlage Pi^{M4} .

CHAPUIS-CELLIER u. ARNAUD (1979) berichteten über gezielte Untersuchungen von M x MZ-Familien. Die Bestimmungen aus solchen Paarungen

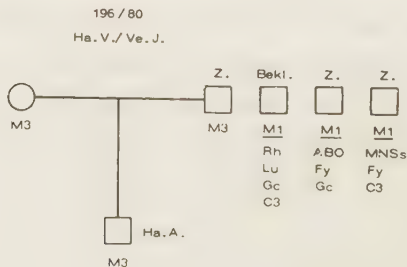
ergaben eine statistisch signifikante Abweichung in der Aufspaltung der zu erwartenden Kinderphänotypen, wenn der Vater Pi^Z -Träger war. Die größere Anzahl der beobachteten MZ-Typen führte zu der Annahme, daß ' Pi^Z -tragende' Spermazellen einen selektiven Vorteil gegenüber ' Pi^M -tragenden' Spermazellen besitzen. Nach AARSKOG et al. (1978) könnte der Vorteil einer verringerten Konzentration des Proteaseinhibitors in einer höheren Aktivität der für die Fertilisation der Eizelle bedeutsamen Proteasen solcher Z-Gameten liegen. Das von uns bislang untersuchte Familienmaterial ist noch zu klein, um solche Beobachtungen zu bestätigen. Die Daten weisen im Augenblick eher auf eine regelmäßige Pi^Z -Vererbung hin.

4.4. Praktische Anwendungsmöglichkeiten

4.4.1. Paternitätsbegutachtung

In forensischen Untersuchungsfällen muß häufig entschieden werden, ob ein der Vaterschaft bezichtigter Mann Vater eines bestimmten nichtehelichen Kindes sein kann. Das Kind muß die Erbanlagen, die es nicht von seiner leiblichen Mutter geerbt haben kann, vom Vater haben. Falls das Kind eine von der Mutter abweichende dominante oder kodominante Anlage besitzt, so sind alle Männer von der Vaterschaft auszuschließen, die diese Anlage nicht haben (klassischer Ausschluß).

Abb. 33 Mehr-Mann-Ausschlüsse in einem Fall durch entgegengesetzte Homozygotie



Im Untersuchungsfall 196/80 ging es um die Feststellung der Vaterschaft. Es kamen vier Männer als Erzeuger des Kindes Ha. A. in Frage. Die Untersuchungen im erweiterten Pi-System ergaben bei Mutter, Kind und einem der drei Zeugen (Z.) den Typ M3M3. Der Beklagte und die beiden anderen Zeugen waren M1 homozygot. Aufgrund der Konstellation entgegengesetzter Reinerbigkeit zwischen Kind und diesen drei Männern lag ein Ausschluß im Pi-System vor. Die Pi-Ausschlüsse ließen sich durch Ausschlüsse in anderen Systemen (ABO, Rh, MNSs, Lu, Fy, Gc, C3) bestätigen. Für den Zeugen, der die Anlage Pi^{M3} mit dem Kind gemeinsam hatte, ergab sich in dessen ein starker Hinweis für die Vaterschaft.

Tab. 20 Ausschlüsse im erweiterten Pi-System

Untersuchte Fälle	n	Ausschlüsse			Summe
		Kläger	Beklagte	Zeugen	
Ein-Mann-Fälle	97	6	5	0	11
Zwei-Mann-Fälle	21	0	0	2	2
Drei-Mann-Fälle	3	0	1	3	4
Vier-Mann-Fälle	2	0	1	2	3
Summe	123	6	7	7	20

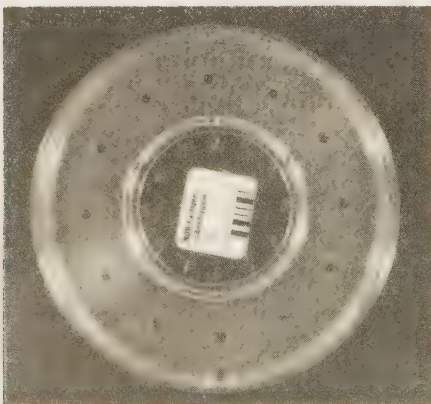
Durch Anwendung der Subtypisierung konnten wir in 123 strittigen Ein- und Mehr-Mann-Fällen insgesamt 20 Männer (6 Kläger, 7 Beklagte, 7 Zeugen) im Pi-System von der angeblichen Vaterschaft ausschließen. Bei einem Ein-Mann-Fall (190/80) ergab sich ein isolierter Pi-Ausschluß (Kind M1M2, Kindesmutter M1M1, Beklagter M1M1). Das Ergebnis der Routineuntersuchung in 24 anderen Systemen (ohne HLA) blieb in diesem Fall indifferent; ähnliches gilt für die anthropologisch-erbbiologische Untersuchung. Obgleich die biostatistische Berechnung nach HUMMEL (1971), unter Ausschluß des Pi-Systems, mit $W > 99.5\%$ starke Gegenargumente lieferte, ließ sich diese klassische Ausschlußkonstellation durch Wiederholung an frischen Proben

bestätigen. Aufgrund unserer Daten errechnet sich für das erweiterte Pi-System eine theoretische Ausschlußwahrscheinlichkeit von 24.3% und eine praktische Ausschlußchance von 16.3%. Die Anwendung in der Paternitätsbegutachtung erscheint nach den vorliegenden Ergebnissen als aussichtsreich. Im Augenblick kann meines Erachtens, wegen der bisweilen noch bestehenden technischen Schwierigkeiten bei der Subtypisierung, einer Ausschlußkonstellation noch nicht die volle Beweiskraft zugemessen werden.

4.4.2. Klinische Medizin

LAURELL u. ERIKSSON (1963) haben erstmals auf die Möglichkeit eines genetisch bedingten Pi-Mangels hingewiesen, für den sich bei späteren Untersuchungen eine Vererbung nach den Mendelschen Regeln ergab. Zum Nachweis eines Pi-Mangels werden neben elektrophoretischen Trenntechniken spezifische, immunochemische Verfahren (radiale Immundiffusion, Elektroimmunoassay) angewandt, da sie eine exakte quantitative Aussage bezüglich einer Verminderung ermöglichen.

Abb. 34 Quantifizierung von α_1 -Antitrypsin durch radiale Immundiffusion



- 1 = Kontrollserum
- 2 = M1M1
- 3 = M1M2
- 4 = M1M3
- 5 = S S
- 6 = M1M4
- 7 = M1 Z
- 8 = M2 Z
- 9 = S Z
- 10 = M1 S
- 11 = Z Z
- 12 = M1M3

Abb. 34 zeigt auf einer Partigenplatte die Immunpräzipitate von 12 Serumproben nach der radialen Immundiffusion. Bei Nummer 1 wurde ein Kontroll-

serum für NOR-Partigen (Behringwerke 04 8802) eingetragen. Nach einer Diffusionszeit von 48 Stunden wurden die Präzipitatriנגdurchmesser der Untersuchungsproben ermittelt. Für das Kontrollserum lag der Wert dabei innerhalb des angegebenen Variationsbereiches ($D = \pm 0.3$ mm). Die den Durchmessern entsprechenden α_1 -AT-Konzentrationen konnten wir einer Bezugswerte-Tabelle entnehmen.

Tab. 21 Serumspiegel von verschiedenen Pi-Typen

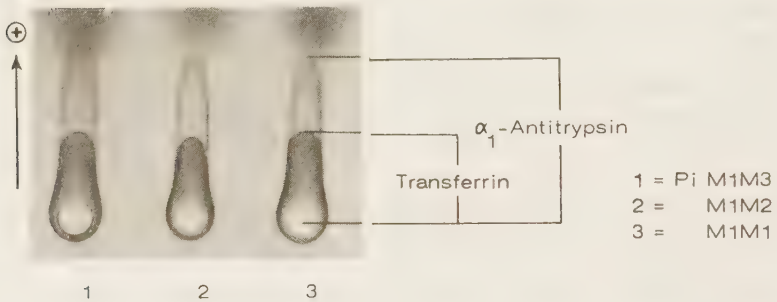
Nr.	Genotyp	Konzentration		Nr.	Genotyp	Konzentration	
		mg/dl	%			mg/dl	%
1	Kontrolle	260	100 ⁺	7	Pi ^{M1} /Pi ^Z	146	56
2	Pi ^{M1} /Pi ^{M1}	248	95	8	Pi ^{M2} /Pi ^Z	125	48
3	Pi ^{M1} /Pi ^{M2}	272	105	9	Pi ^S /Pi ^Z	78	30
4	Pi ^{M1} /Pi ^{M3}	298	115	10	Pi ^{M1} /Pi ^S	235	91
5	Pi ^S /Pi ^S	167	64	11	Pi ^Z /Pi ^Z	43	16
6	Pi ^{M1} /Pi ^{M4}	260	100	12	Pi ^{M1} /Pi ^{M3}	366	141

Die gefundenen α_1 -AT-Konzentrationen stimmen mit den Analysenwerten anderer Autoren gut überein (KUEPPERS, 1971; LAURELL u. SVEGER, 1975; BECKMAN u. BECKMAN, 1980). Nach JEPSSON (1978) erscheint eine routinemäßige Pi-Typisierung in all den Fällen angezeigt, bei denen die Serumkonzentration unter 40% der Norm liegt.

Bei einzelnen Untersuchungsproben wurde der Serumspiegel mit der Raketen-immunelektrophorese überprüft. Die folgende Abbildung zeigt die Immunpräzipitate zweier Serumproteine in Form von Raketen. Das Transferrin diente dabei als interner Standard. Aus dem Verhältnis der Raketenhöhe ließ sich das α_1 -Antitrypsin semiquantitativ bestimmen. Die gefundenen Werte ergaben gegenüber der radialen Immundiffusion keine signifikante Abweichung.

⁺ Der 100%-Wert entspricht dem Mittelwert des Proteingehalts im Serum (Plasma) gesunder erwachsener Mitteleuropäer.

Abb. 35 Raketenimmunelektrophorese zur quantitativen Bestimmung des α_1 -Antitrypsins. Antigen: 5 μ l Humanserum (Verdünnung 1 : 40), Antikörper: 2 μ l/cm² Kaninchen-Immunglobuline (DAKO-Immunglobuline Boehringer: α_1 -Antitrypsin 10-012, Transferrin 10-061)



Eine klinische Bedeutung kommt vor allem den relativ häufigen drei Typen Pi ZZ ("klassische Form" des α_1 -Antitrypsinmangels), SZ und MZ zu, da sie mit einer deutlich verminderten α_1 -AT-Konzentration einhergehen. Bei Pi^Z-Homozygoten führt ein Mangel häufig zu schweren Beeinträchtigungen der Lungenfunktion. Bekanntlich nimmt die Häufigkeit des Emphysems mit fortschreitendem Lebensalter infolge des Schwundes der Elastizität des Lungengewebes zu. Die Frage, ob auch MZ-, MS- und SS-Individuen vermehrt zur Ausbildung eines chronisch obstruktiven Lungenemphysems prädisponiert sind, kann gegenwärtig nicht allgemein und eindeutig entschieden werden. Um einer Antwort dieser Frage näher zukommen, führen wir zur Zeit eine Untersuchung bei Lungenpatienten vom Zentralkrankenhaus Gauting bei München durch.

Das Auftreten eines Lungenemphysems kann noch durch andere Faktoren, wie z. B. das Rauchen, begünstigt werden. Bei Lungenfunktionsanalysen fanden sich bei MZ-Rauchern im Vergleich zu MZ-Nichtrauchern vermehrt obstruktive Ventilationsstörungen (KUEPPERS u. BEARN, 1966; ERIKSSON et al., 1975; JEPPSSON, 1978). Die Kenntnis des Pi-Typs könnte somit für Raucher prognostisch bedeutsam sein, da das Risiko einer genetischen Disposition für die Entwicklung eines Lungenemphysems auszuschließen ist.

Dies trifft nicht nur für die häufigen MZ-Individuen zu, sondern gilt grundsätzlich für Typen mit einem Serumspiegel unter 50% der Norm (siehe Tab. 21).

Bei klinischen Untersuchungen von Lungenpatienten haben FALK u. BRISCOE (1970) festgestellt, daß MZ-Heterozygote häufiger an chronisch obstruktivem Lungenemphysem vom Typ B (primäre Bronchitis) und ZZ-Homozygote öfter an Typ A (primäres Emphysem) leiden. Wahrscheinlich hängt der Ort der initialen Gewebsschädigung vom α_1 -AT-Spiegel ab. Eine intermediäre Konzentration könnte demnach für einen Schutz der Alveolarmembran ausreichen, würde aber bei entsprechender Irritation der Bronchien nicht mehr zum Schutz gegen proteolytische Enzyme an dieser Stelle genügen.

Abb. 36 Pi-Phänotypen mit atypischer Z-Bande nach PAGIF (a) und darauf-
folgender Immunfixation (b)

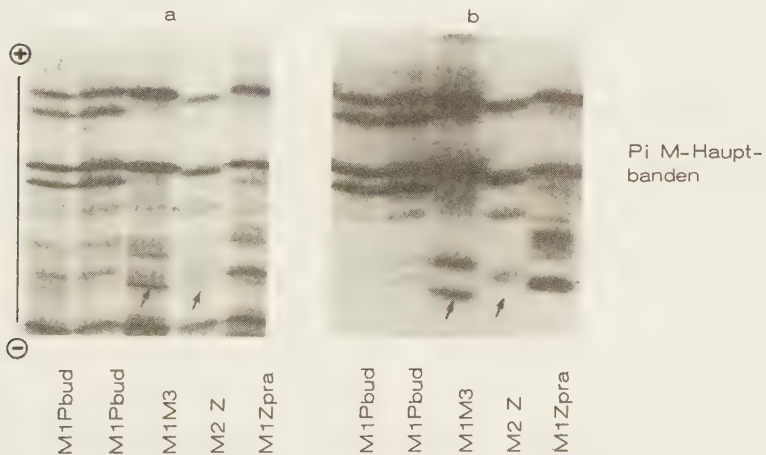


Abb. 36 zeigt die Phänotypen M1M3 und M2Z mit einer zusätzlichen atypischen Z-Bande (siehe Pfeile) neben M1Pbud und M1Zpra. Diese atypische Bande, welche mit einem monospezifischen α_1 -AT-Antiserum reagiert, weist dabei einen ähnlichen pl-Wert wie die kathodale Hauptbande von Pi Z1 auf. Wir gaben ihr die vorläufige Bezeichnung "Pi Z2". Sie wurde bislang bei fünf erwachsenen Personen, darunter drei Lungenpatienten, gefunden. Die Patienten hatten einen erhöhten Serumspiegel der alkalischen Phosphatase

und der Transaminasen. Mit Ausnahme des Typs M2Z (Patient mit nutritiv-toxischen Leberschaden) lagen die α_1 -AT-Werte innerhalb des Variationsbereiches (200 - 400 mg/dl). Die atypische Z-Bande wurde noch in zwei anderen Laboratorien (persönl. Mitteilung von Herrn Dr. Kühnl, Frankfurt, und Herrn Prof. Hug, M.D., Cincinnati, U.S.A.) bei Patienten mit einem ähnlichen Krankheitsbild beobachtet. Es ist anzunehmen, daß diese auffällige Bande mit einer Lebererkrankung in Zusammenhang steht.

Auf eine Assoziation von α_1 -AT-Mangel und infantiler Leberzirrhose wurde schon 1969 von SHARP et al. hingewiesen. Die meisten Patienten waren dabei Pi^Z -Homozygote. Das Krankheitsbild und der Verlauf ist in den beschriebenen Fällen sehr ähnlich: vermehrte Speicherung von α_1 -Antitrypsin in den Leberzellen in Form von PAS-positiven Granula, Hepatosplenomegalie von unterschiedlicher Stärke, Ikterus und Erhöhung der alkalischen Phosphatase- und Transaminasewerte im Serum.

Die Möglichkeiten für eine spezifische Therapie des α_1 -AT-Mangels sind beschränkt. Eine Substitutionstherapie ist wegen der kurzen Halbwertszeit von 4 - 6 Tagen in vivo kaum durchführbar (KUEPPERS u. FALLAT, 1969; MAKINO u. REED, 1970). Auch gibt es gegenwärtig kein Medikament, welches eventuell zur vermehrten Freisetzung des α_1 -Antitrypsins aus den Leberzellen von ZZ-Individuen erfolgreich eingesetzt werden könnte.

5. Schlußbetrachtung

Blutgruppen und Blutfaktoren nehmen unter den normalen anthropologischen Merkmalen eine Sonderstellung ein, da sie monogen erblich und weitgehend umweltstabil sind. Durch den Einsatz verbesserter Methoden konnte man in den vergangenen Jahren eine wachsende Anzahl genetisch determinierter Proteinvarianten entdecken. Die größere Zahl der Allele und die günstige Verteilung der Phänotypen spiegelt sich bei den Systemen PGM₁, Gc, Tf und Pi in der wesentlich erhöhten allgemeinen Vaterschaftsausschlußchance (AVACH) wider. In Tab. 22 sind die Ausschlußchancen der Subtypenallelsysteme zusammengefaßt. Im Vergleich zu normalen herkömmlichen Trenn-

techniken verzeichnet das Pi-System mit 19.5 % (ohne Subtypisierung = 4.8 %, mit Subtypisierung = 24.3 %) den größten Zuwachs, gefolgt von Tf (17.7 %), Gc (13.5 %) und PGM₁ (10.4 %).

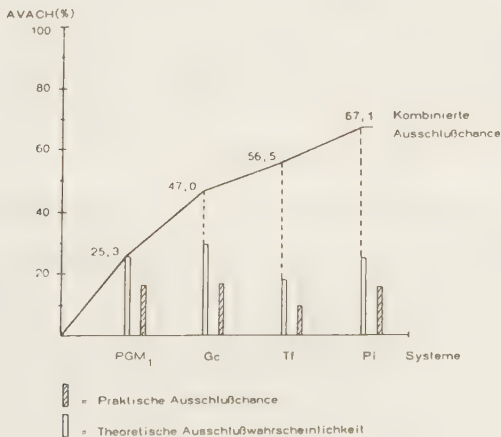
Tab. 22 Gegenüberstellung der Vaterschaftsausschlußchancen

Systeme	Ein- und Mehr- Mann - Fälle	Ausschlüsse		Ausschlußchance	
		insgesamt	isoliert	P (%)	T (%)
PGM ₁	339	57	3	16.8	25.3 (14.9)
Gc	306	52	2	17.0	29.1 (15.6)
Tf	241	23	1	9.5	18.7 (1.0)
Pi	123	20	1	16.3	24.3 (4.8)

Es bedeutet: P = praktisch; T = theoretisch

Die in Klammern stehenden Werte gelten für die nichterweiterten Systeme.

Abb. 37 Graphische Darstellung der Ausschlußchancen



Die kombinierte Ausschlußchance in den vier beschriebenen Subtypenallelsystemen beträgt 67,1 %, d.h. damit könnten bereits mehr als Zweidrittel aller Nichtväter erkannt werden. Im Vergleich zur kombinierten Ausschlußchance mit den herkömmlichen Verfahren (32 %) beinhaltet diese Zahl einen Informationszuwachs um mehr als das Doppelte. Durch Hinzunahme der klassischen Blutgruppen und der übrigen Enzym- und Serumgruppen (siehe S.57) läßt sich in über 90 % der Fälle die Vaterschaft klären. In Zweifelsfällen, bei denen trotz Einbeziehung der erweiterten Systeme keine ausreichende Klärung möglich ist, empfiehlt sich die ergänzende Untersuchung im Histokompatibilitätssystem (HLA).

Über die zweckmäßige Reihenfolge der zu untersuchenden Systeme ist man sich bislang noch uneinig. Die von MAYR (1977) vorgeschlagene Reihenfolge ABO, MNSs, Rh, HLA und danach andere Systeme, halten wir für nicht besonders praktikabel. An erster Stelle sollten zweifellos die Systeme des Normgutachtens (ABO, MNSs, Rh, K, Fy, Hp, Gc, Gm, Inv, acP, PGM₁, ADA, AK, 6-PGD, EsD) stehen, ob man danach das HLA-System oder die Subtypenallelsysteme untersucht, bleibt dem Blutgruppensachverständigen bzw. dem Gericht überlassen.

Formalgenetische und populationsgenetische Daten lassen die Anwendung weiterer Untergruppensysteme wie z.B. Galactose-1-phosphat-uridyltransferase (Gt) (WEIDINGER et al., 1981_a), Amylase 1 (AMY₁) (KUEHN u. TISCHBERGER, 1980) und 6. Komponente des Komplementsystems (C6) (RITTNER et al., 1979) als aussichtsreich erscheinen.

Das Konzept der 'biochemischen Individualität', das Anfang unseres Jahrhunderts schon von GARROD erahnt wurde, ist durch die Entdeckung immer neuer Blutgruppen-, Serumprotein- und Enzym-Polymorphismen in eindrucksvollerweise bewiesen worden. Es ist anzunehmen, daß die Zahl der genetisch determinierten Polymorphismen des Menschen (z.Z. über 100) mit der Einführung neuer technischer Methoden (z.B. zwei-dimensionale Gelelektrophorese) auch weiterhin rasch zunehmen wird.

E ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit Untersuchungen von erythrozytären Isoenzymen und Serumproteinen mittels der isoelektrischen Fokussierung auf Polyacrylamidgelen (PAGIF) und Agarosegelen (AGIF). Im Mittelpunkt standen die erweiterten genetischen Polymorphismen von Phosphoglucomutase I (PGM_1), Gruppenspezifischer Komponente (Gc), Transferrin (Tf) und Alpha₁-Antitrypsin (Pi). Im einzelnen wurden folgende wesentliche Befunde erhoben:

1. Im PGM_1 -System konnten wir mit zwei verschiedenen Fokussiermethoden (AGIF und PAGIF) die Existenz von vier Subtypenallelen nachweisen. Bei einer Stichprobe von 1157 nichtverwandten Personen aus Süddeutschland wurden zehn häufige PGM_1 -Untertypen beobachtet; zudem fanden sich fünf seltene Varianten ($\text{PGM}_1 3$, $\text{PGM}_1 4$, $\text{PGM}_1 5$, $\text{PGM}_1 6$ und $\text{PGM}_1 7$) im heterozygoten Zustand. Für unsere Stichprobe ergaben sich folgende Allelfrequenzen: $\text{PGM}_1^{1+} = 0.6262$, $\text{PGM}_1^{1-} = 0.1275$, $\text{PGM}_1^{2+} = 0.1997$, $\text{PGM}_1^{2-} = 0.0449$ und $\text{PGM}_1^{\text{Var}} = 0.0017$. Bei der Untersuchung von 264 'sicheren Gutachtenfamilien' konnten wir keine Abweichung vom angenommenen autosomal kodominanten Erbgang feststellen. In einem Gutachtenfall, bei dem nach Untersuchung sämtlicher genetischer Marker eine isolierte konträre Konstellation im PGM_1 -System verblieb, wurde auf die Existenz eines 'stummen' Allels hingewiesen. Die populationsgenetischen Daten decken sich mit den Untersuchungsergebnissen anderer Autoren.
2. Im Gc-System wurden die Phänotypen mit zwei unterschiedlichen PAGIF-Methoden bestimmt. Mit der Immunfixation konnten wir außer den sechs häufigen Gc-Phänotypen den seltenen Typ Gc 1C3 beobachten; zudem wurden zwei neue Gc 2-Varianten, die wir als Gc 2A8 und Gc 2C3 bezeichneten, gefunden. Die Untersuchung von 728 nichtverwandten Personen ergab folgende Allelenhäufigkeit: $\text{Gc}^{1S} = 0.6023$, $\text{Gc}^{1F} = 0.1474$, $\text{Gc}^2 = 0.2549$ und $\text{Gc}^{\text{Var}} = 0.0014$. Der autosomal kodominante Erbgang

der Subtypenallele ließ sich durch die Untersuchung von 171 Familien bestätigen. Für den Typ Gc 2C3 wurde die seltene Anlage bei Kind und 'Vater' nachgewiesen. Bei 306 strittigen Ein- und Mehrmannfällen ergaben sich insgesamt 52 Ausschlüsse. Mit Ausnahme von zwei isolierten Gc-Ausschlüssen decken sich diese Ausschlüsse mit denen anderer Merkmalsysteme.

3. Im Tf-System wurde der erweiterte Polymorphismus an zwei Kollektiven untersucht. In Kollektiv 1 ($n = 450$) haben wir drei häufige Tf C-Subtypen unterschieden; zudem fanden sich die seltenen Varianten Tf B1, B 1-2, B2 und D1 im heterozygoten Zustand. Die Allelfrequenzen in dieser Stichprobe betrugen: $Tf^{C1} = 0.8544$, $Tf^{C2} = 0.1367$ und $Tf^{Var} = 0.0089$. Modifizierung der Methode durch Zusatz von 0.01 M FeCl_3 zu den Seren vor der Auftrennung ließ weitere Variation erkennbar werden und erlaubte sechs häufige Tf C-Untertypen zu differenzieren. Die Allelfrequenzen für Kollektiv 2 ($n = 558$) lauten: $Tf^{C1} = 0.7885$, $Tf^{C2} = 0.1389$, $Tf^{C3} = 0.0673$ und $Tf^{Var} = 0.0053$. Die Aufspaltung von Tf^{C1} in die Subtypenallele Tf^{C1} und Tf^{C3} wurde hiermit bewiesen. Die Untersuchung von 110 Familien mit insgesamt 110 Kindern ergab keine Abweichung vom angenommenen autosomal kodominanten Vererbungsmodus. Auf das Vorkommen eines neuen Subtyps Tf C3-6 und einer 'neuen' Tf B-Variante, vorläufig als $Tf B_x$ bezeichnet, wurde hingewiesen. Zur sicheren Typisierung wurde die Immunfixation angewandt.
4. Im Pi-System wurden die genetischen Variationen des Proteaseinhibitors Alpha₁-Antitrypsin an zwei Kollektiven untersucht. In der 1. Studie wurden bei 347 nichtverwandten gesunden Personen sechs häufige Pi M-Subtypen differenziert; neben Pi S und Pi Z fanden sich die seltenen Varianten Pi F, I, L, <L und T sowie eine als Pi Z1 bezeichnete neue Variante. Folgende Allelfrequenzen wurden errechnet: $Pi^{M1} = 0.6917$, $Pi^{M2} = 0.1686$, $Pi^{M3} = 0.0865$, $Pi^S = 0.0230$, $Pi^Z = 0.0187$ und $Pi^{Var} = 0.0115$. Nach der Entdeckung eines vierten Pi^M -Allels ließen sich mit einer verbesserten Typisierungstechnik zehn Pi M-Subtypen unterscheiden. In der 2. Studie

konnten wir bei 384 Personen neun verschiedene Pi M-Typen beobachten. Für das Subtypenallel Pi^{M4} wurde erstmals eine Frequenz von 0.0183 ermittelt. Der autosomal kodominante Erbgang der Subtypenallele wurde durch Familienuntersuchungen bestätigt. Aus pädiatrisch-klinischem Interesse führten wir bei verschiedenen Pi-Typen quantitative Bestimmungen (radiale Immundiffusion, Raketenimmunelektrophorese) durch. Bei den Mangeltypen ZZ, SZ und MZ ergaben sich dabei deutlich verminderte α_1 -AT-Konzentrationen. In diesem Zusammenhang wurde auf eine atypische Z-Bande (Z2), die wir bei Patienten mit Leberschaden fanden, hingewiesen.

Mit der vorliegenden Arbeit wurden die Voraussetzungen für eine routinemäßige Anwendung in der Paternitätsbegutachtung geschaffen. Der Nutzen dieser Systeme liegt im wesentlich erhöhten Informationswert, der sich durch die Subtypisierung ergibt.

F LITERATURVERZEICHNIS

1. Aarskog D, Aarseth P, Fagerhol MK (1978) Alpha₁-antitrypsin (Pi)-types in recurrent miscarriages. Clin Genet 13: 81-84
2. Allen RC, Harley RA, Talamo RC (1974) New method for determination of alpha₁-antitrypsin phenotypes using isoelectric focusing on polyacrylamide gel slabs. Amer J Clin Path 62: 732-739
3. Alper CA, Johnson AM (1969) Immunfixation electrophoresis: A technique for the study of protein polymorphism. Vox Sang 17: 445-452
4. Altland K, Hackler R, Knoche W (1980) Double one-dimensional electrophoresis of human serum transferrin: A new high-resolution screening method for genetically determined variation. Hum Genet 54: 221-231
5. Arnaud Ph, Chapuis-Cellier C, Creysse R (1975) The Pi system: Its study by means of thin-layer-gel electrofocusing in polyacrylamide gel. In: Peters H (ed) 22nd Colloquium, proteins of the biological fluids. Oxford: Pergamon pp 515-520
6. Arnaud Ph, Galbraith RM, Faulk WP, Black C (1979) Pi phenotypes of alpha₁-antitrypsin in Southern England: Identification of Pi M subtypes and implications for genetic studies. Clin Genet 15: 406-410
7. Arora PK, Miller HC, Aronson ID (1978) Alpha₁-antitrypsin is an effector of immunological stasis. Nature 274: 589-590
8. Azari PR, Feeney RE (1958) Resistance of the metal complexes of conalbumin and transferrin to proteolysis and thermal denaturation. J Biol Chem 232: 293
9. Bark JE, Harris MJ, Firth M (1976) Typing of the common phosphoglucomutase variants using isoelectric focusing. A new interpretation of the phosphoglucomutase system. J Forensic Sci Soc 16: 115-120
10. Bearn AG, Kitchin FD, Bowman BH (1964) Heterogeneity of the inherited group-specific component of human serum. J Exp Med 120: 83-91

11. Beckman G, Beckman L (1980) Serum levels of α_1 -antitrypsin in individuals with different Pi M subtypes. *Hum Hered* 30: 81-83
12. Beckman G, Beckman L, Sikström C (1980) Transferrin C subtypes and spontaneous abortion. *Hum Hered* 30: 316-319
13. Begemann H (1975) *Klinische Hämatologie*. Thieme Verl Stuttgart
14. Bender K, Strohmaier U, Schroetter K (1981) Pi-Polymorphismus: Segregationsanalysen in kinderreichen Familien. In: Hummel K, Gerchow J (Hrsg) *Biomathematical evidence of paternity*. Springer Verl Berlin-Heidelberg: 139-144
15. Berg K, Saugstad LF (1974) A linkage study of phenylketonuria. *Clin Genet* 6: 147-152
16. Bezkorovainy A, Grohlich D (1974) Comparative study of several proteins of the transferrin class. *Comp Biochem Physiol* 47 B: 787-797
17. Bissbort S, Ritter H, Kömpf J (1978) PGM₁ subtyping by means of acid starch gel electrophoresis. *Hum Genet* 45: 175-177
18. Bouillon R, van Baelen H, Rombants W, de Moor P (1976) The purification and characterisation of the human-serum binding protein for the 25-hydroxycholecalciferol (transcalciferin). Identity with group-specific component. *Europ J Biochem* 66: 285-291
19. Briscoe WA, Kueppers F, Davis AL, Bearn AG (1966) A case of inherited deficiency of serum α_1 -antitrypsin associated with pulmonary emphysema. *Amer Rev resp Dis* 94: 529-539
20. Chapuis-Cellier C, Arnaud Ph (1979) Preferential transmission of the Z-deficient allele of α_1 -antitrypsin. *Science* 205: 407-408
21. Charlionet R, Sesboué R, Morcamp C, Lefebvre F, Martin JP (1981) Genetic variants of serum α_1 -antitrypsin (Pi-types) in Normans. *Hum Hered* 31: 104-109

22. Chautard-Freire-Maia EA (1977) Probable assignment of the serum cholin-
esterase (E_1) and transferrin (Tf) loci to chromosome 1 in man. *Hum*
Hered 27: 134-142
23. Cleve H, Bearn AG (1962) The group specific component of serum, genetic
and chemical considerations. *Progr med Genet* 2: 64-82
24. Cleve H, Bearn AG (1963) Genetic and chemical aspects of the group speci-
fic component. *Proc 2nd Int Congr hum Genet*, Rome 1961, Istituto
Mendel Rom
25. Cleve H, Patutschnick W (1977) The vitamin D binding of the common and
rare variants of the group-specific component (Gc). *Hum Genet* 38:
289-296
26. Cleve H, Patutschnick W (1979) Neuraminidase treatment reveals sialic
differences in certain genetic variants of the Gc system (Vitamin-D-
binding protein). *Hum Genet* 47: 193-198
27. Cleve H, Prunier JH, Bearn AG (1963) Isolation and partial characterization
of the two principal inherited group-specific components of human serum.
J exp Med 118: 711-726
28. Cleve H, Kirk RL, Parker WC, Bearn AG, Schacht LE, Kleinman H, Hors-
fall WR (1963a) Two genetic variants of the group-specific component
of human serum: Gc Chippewa, Gc Aborigine. *Amer J hum Genet* 15:
368-379
29. Cleve H, Patutschnick W, Nevo S, Wendt GG (1978) Genetic studies on the
Gc subtypes. *Hum Genet* 44: 117-122
30. Cleve H, Patutschnick W, Strecker K, Nevo S (1979) Inheritance of Pi M
subtypes. A study of 151 families with a total of 242 children and 142
mother-child pairs. *Hum Hered* 29: 351-354
31. Cleve H, Constans J, Berg S, Hoste B, Ishimoto G, Matsumoto H, Spees EK,
Weber W (1981) Gc revisited: Six further Gc-phenotypes delineated
by isoelectric focusing and by polyacrylamide gel electrophoresis.
Hum Genet 57: 312-316

32. Constans J, Viau M (1975) Une nouvelle mutation Pi au locus Pi dans les populations humaines. CR Acad Sci (Paris) 281: 1361-1364
33. Constans J, Viau M (1977) Group-specific component: Evidence for two subtypes of the Gc¹ gene. Science 198: 1070-1071
34. Constans J, Viau M, Cleve H, Jaeger G, Quilici JC, Palisson MJ (1978) Analysis of the Gc polymorphism in human populations by isoelectrofocusing on polyacrylamide gels. Demonstration of the Gc¹ allele and of additional Gc variants. Hum Genet 41: 53-60
35. Constans J, Viau M, Moatti JP, Clavere JL (1979) Serum Vitamin D binding protein and Gc polymorphism. Vitamin D, basic research and its clinical application. de Gruyter Berlin-New York pp 153-156
36. Constans J, Kühnl P, Viau M, Spielmann W (1980) A new procedure for the determination of transferrin^C (Tf^C) subtypes by isoelectric focusing. Hum Genet 55: 111-114
37. Constans J, Viau M, Gouaillard C (1980 a) Pi^{M4}: An additional Pi^M subtype. Hum Genet 55: 119-121
38. Constans J, Viau M, Jaeger G, Palisson MJ (1981) Gc, Tf, Hp-subtype and α_1 -antitrypsin polymorphism in a Pygmy Bi-Aka sample. Hum Hered 31: 129-137
39. Cook P.J.L., Hamerton J.L. (1979) Report of the committee on the genetic constitution of chromosome 1. Cytogenet Cell Genet 25: 9-20
40. Cousineau J, Higgins J.V., Hackel E, Waterman D.F., Toriello H, Carlile P.A. Cook P.J.L. (1981) Cytogenetic recognition of chromosomal duplication [dup (1)(p31.4→p22.1)] and the detection of three different alleles at the PGM₁ locus. Ann Hum Genet 45: 337-340
41. Cox D.W. (1980) Transmission of Z allele from heterozygotes for α_1 -antitrypsin deficiency. Am J Hum Genet 32: 455-457
42. Cox D.W., Celhoffer L. (1974) Inherited variants of α_1 -antitrypsin: A new allele Pi^N. Canad J Genet Cytol 16: 297-303

43. Cox DW, Huber O (1976) *Lancet* 1216-1217
44. Cox DW, Johnson AM, Fagerhol MK (1980) Report of Nomenclature meeting for α_1 -antitrypsin. *Hum Genet* 53: 429-433
45. Daiger SP, Cavalli-Sforza LL (1977) Detection of genetic variation with radioactive ligands. II. Genetic variants of vitamin D-labeled group-specific component (Gc) proteins. *Am J Hum Genet* 29: 593-604
46. Daiger SP, Schanfield MS, Cavalli-Sforza LL (1975) Group-specific component (Gc) proteins bind vitamin D and 25-hydroxyvitamin D. *Proc nat Acad Sci (Washington)* 72: 2076-2080
47. Dancis J, Braverman N, Lind J (1957) Plasma protein synthesis in the human fetus and placenta. *J Clin Invest* 36: 398
48. Edwards Y, Hopkinson DA (1980) Are abundant proteins less variable? *Nature* 284: 511-512
49. Eriksson S (1964) Pulmonary emphysema and α_1 -antitrypsin deficiency. *Acta med scand* 175: 197
50. Eriksson S (1965) Studies in α_1 -antitrypsin deficiency. *Acta med scand* 177 (Suppl) 432: 1-85
51. Eriksson S, Larsson C (1975) Purification and partial characterization of PAS-positive inclusion bodies from the liver in α_1 -antitrypsin deficiency. *New Engl J Med* 292: 176-180
52. Eriksson S, Moestrup T, Hägerstrand J (1975) Liver, lung and malignant disease in heterozygous (Pi MZ) α_1 -antitrypsin deficiency. *Acta med scand* 198: 242-247
53. Fagerhol MK (1969) Quantitative studies on the inherited variants of serum α_1 -antitrypsin. *Scand J clin Lab Invest* 23: 97-103
54. Fagerhol MK (1972) Acid starch gel electrophoresis for detection of α_1 -antitrypsin (Pi types): Outline of techniques employed currently. In: Mittman C (ed), *Pulmonary emphysema and proteolysis*. Acad Press New York-London pp 145

55. Fagerhol MK, Braend M (1965) Serum prealbumin: Polymorphism in man. *Science* 149: 986
56. Fagerhol MK, Cox DW (1981) The Pi polymorphism. Genetic, biochemical, and clinical aspects of human α_1 -antitrypsin. In: Harris H, Hirschhorn K (eds) *Advances in Hum Genetics* 11. Plenum Press New York-London: 1-62
57. Fagerhol MK, Laurell CB (1970) The Pi system- inherited variants of serum α_1 -antitrypsin. In: Steinberg AG, Bearn AG (eds) *Progress in medical genetics; Vol VII*. Grune & Stratton, New York, pp 96-111
58. Fagerhol MK, Tenfjord OW (1968) Serum Pi types in some European, American, Asian and African populations. *Acta path microbiol scand* 72: 601
59. Falk GA, Briscoe WA (1970) Alpha $_1$ -antitrypsin deficiency in chronic obstructive pulmonary disease. *Ann intern Med* 72: 427
60. Fiedler H, Pettenkofer H (1968) Ein "neuer" Phänotyp im Isoenzymssystem der Phosphoglucumutasen des Menschen (PGM $_1$ 0). 1. Mitteilung. *Blut* 18: 33
61. Fineman RM, Johnson AM, Breg WR (1976) Increased frequency of heterozygotes for α_1 -antitrypsin variants in individuals with either sex chromosome mosaicism or trisomy 21. *Nature* 260: 320-321
62. Fletcher J, Huehns ER (1968) Funktion of transferrin. *Nature* 218: 1211-1214
63. Frants RR, Eriksson AW (1976) α_1 -antitrypsin: Common subtypes of Pi M. *Hum Hered* 26: 435-440
64. Frants RR, Eriksson AW (1978) Reliable classification of six Pi M subtypes by separator isoelectric focusing. *Hum Hered* 28: 201-209
65. Ganrot PO, Bjerre B (1967) Alpha $_1$ -antitrypsin and alpha $_2$ -macroglobulin concentration in serum during pregnancy. *Acta obstet gynec scand* 46: 126
66. Ganrot PO, Laurell CB, Eriksson S (1967) Obstructive lung disease and trypsin inhibitors in alpha $_1$ -antitrypsin deficiency. *Scand J Clin Lab Invest* 19: 205-208

67. Gedde-Dahl T jr, Fagerhol MK, Cook PJL, Noades J (1972) Autosomal linkage between the Gm and Pi loci in man. *Ann hum Genet* 35:393-399
68. Gedde-Dahl T jr, Cook PJL, Fagerhol MK, Pierce JA (1975) Improved estimate of the Gm-Pi linkage. *Ann Hum Genet* 39: 43-50
69. Gelfand EW, Cox DW, Lim MT, Dosch HM (1979) *Lancet* ii 202
70. Genz T, Martin JP, Cleve H (1977) Classification of α_1 -antitrypsin (Pi) phenotypes by isoelectrofocusing. *Hum Genet* 38: 325-332
71. Gerritsen T, Walker APR (1954) Effect of habitually high iron intake on certain blood values in pregnant Bantu women. *J Clin Invest* 33: 23-26
72. Giblett ER (1969) Genetic markers in human blood. Oxford-Edinburgh: Blackwell pp. 126-159
73. Gitlin D, Janeway CA, Farr LE (1956) Studies on the metabolism of plasma proteins in the nephrotic syndrome. I. Albumin, γ -globulin and iron-binding globulin. *J Clin Invest* 35: 44
74. Grabar P, Williams CA (1953) Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines. Application au serum sanguin. *Biochem biophys Acta* 10: 193
75. Harris H (1966) Enzyme polymorphism in man. *Proc Roy Soc B* 164: 298
76. Harris H (1970) The principles of human biochemical genetics. North-Holland Publ Amsterdam
77. Harris H, Hopkinson DA, Luffman JE, Rapley S (1968) Electrophoretic variation in red cell enzymes. In: Beutler (ed) Grune & Stratton, New York
78. Heck LW, Kaplan AP (1974) A role for α_1 -antitrypsin in the regulation of coagulation (Abstr) *Fed Proc* 33: 642
79. Heilmeyer L, Keller W, Vivell O, Kerderling W, Betke K, Wöhler F, Schultze HE (1961) Kongenitale Atransferrinämie bei einem sieben Jahre alten Kind. *Dtsch med Wschr* 86: 1745-1751

80. Heimbürger N, Haupt H (1966) Zur Spezifität der Antiproteinasen des Humanplasmas für Elastase. *Klin Wschr* 44: 1196-1199
81. Heimbürger N, Heide K, Haupt H, Schultze HE (1964) Bausteinanalysen von Humanserumproteinen. *Clin chim Acta* 10: 293-307
82. Heimbürger N, Haupt H, Schwick HG (1971) Proteinase inhibitors in human plasma. In: Fritz H, Tschesche M (eds) *Proceedings of the international research conference on proteinase inhibitors*. München 1970, de Gruyter Berlin : 1
83. Hennig W, Hoppe H (1965) A new allele in the Gc-system: Gc^Z. *Vox Sang* 10: 214-217
84. Hirschfeld J (1959) Immuno-electrophoretic demonstration of quantitative differences in human sera and their relation to the haptoglobins. *Acta path microbiol scand* 47: 160-168
85. Hirschfeld J (1962) The Gc-system. *Progr Allergy* 6: 155-186
86. Hirschfeld J, Jonsson B, Rasmuson M (1960) Inheritance of a new group specific system demonstrated in normal human sera by means of an immunoelectrophoretic technique. *Nature* 185: 931-932
87. Hobart MJ, Rabbitts TH, Goodfellow PN, Solomon E, Chambers S, Spurr N, Povey S (1981) Immunglobulin heavy chain genes in humans are located on chromosome 14. *Ann Hum Genet* 45: 331-335
88. Hopkinson DA, Harris H (1965) Evidence for a second 'structural' locus determining human phosphoglucomutase. *Nature* 208: 410-412
89. Hopkinson DA, Harris H (1966) Rare phosphoglucomutase phenotypes. *Ann hum Genet* 30: 167-181
90. Horne CHW, Mallison AC, Ferguson J (1971) Effects of oestrogen and progestogen on serum levels of α_2 -macroglobulin, transferrin, albumin and IgG. *J Clin Path* 24: 464-466
91. Horsfall WR, Smithies O (1958) Genetic control of some human serum β -globulins. *Science* 128: 35

92. Hoste B (1979) Group-specific component (Gc) and Transferrin (Tf) subtypes ascertained by isoelectric focusing. *Hum Genet* 50: 75-79
93. Hovanessian AG, Awdeh ZL (1976) Gel isoelectric focusing of human-serum transferrin. *Eur J Biochem* 68: 333-338
94. Hummel K, Ihm P, Schmidt V (1971) Biostatistische Abstammungsbegutachtung mit Blutgruppenbefunden. Fischer-Verl Stuttgart: 1-184
95. Iammarino RM, Wagener DK, Allen RC (1979) Segregation distortion of the α_1 -antitrypsin Pi^Z allele. *Am J Hum Genet* 31: 508-517
96. Ishimoto G, Kawata M (1972) The typing of red cell enzymes by isoelectric focusing in gels. *Rep nat Res Inst Police Sci, Japan* 25: 13-16
97. Jacobsson K (1955) I. Studies on the determination of fibrinogen in human blood plasma. II. Studies on the trypsin and plasmin inhibitors in human blood serum. *Scand J Clin Lab Invest* 7 (Suppl) 14
98. Jamieson GA, Jett M, De Bernardo SL (1971) The carbohydrate sequence of the glycopeptide chain of human transferrin. *J Biol Chem* 246: 3686-3693
99. Janoff A, Basch S (1971) Further studies on elastase-like esterases in human leucocyte granules. *Proc Soc exp Biol, New York* 136: 1045
100. Janssen W, Jobmann K, Brinkmann B (1981) Transferrin C-Subtypen in Norddeutschland. Studie zur Populations- und Formagenetik. *Ärztl Lab* 27: 35-37
101. Jeejeebhoy KN, Bruce-Robertson A, Ho J (1972) The effect of cortisol on the synthesis of rat plasma albumin, fibrinogen and transferrin. *Biochem J* 130: 533-538
102. Jeppsson JO (1976) Amino acid substitution Glu leads to Lys α_1 -antitrypsin Pi^Z . *FEBS Lett* 65: 195-197
103. Jeppsson JO (1977) Electrofocusing of α_1 -antitrypsin. In: Radola BJ, Graesslin D (eds) *Electrofocusing and isotachophoresis. Int Symp Hamburg 1976*, de Gruyter Berlin-New York

104. Jeppsson JO (1978) α_1 -Antitrypsin: Klinische und chemische Aspekte. Behringwerke AG, Laboratoriumsblätter 2: 45-53
105. Jeppsson JO, Laurell CB (1975) Proteases and biological control. In: Cold Spring Harbor Lab pp. 405
106. Jørgensen G (1965) Immunelektrophoretische Untersuchungen über die Thermostabilität des heterozygoten Gc 2-1 Typs. Hum Genet 1:303-306
107. Johnson AM (1976) Genetic typing of α_1 -antitrypsin by immunofixation electrophoresis. Identification of subtypes of Pi M. J Lab clin Med 87: 152-163
108. Johnson AM, Cleve H, Alper C (1975) Variants of the group-specific component system as demonstrated by immunofixation electrophoresis. Report of a new variant, Gc Boston (Gc B). Am J Hum Genet 27: 728-736
109. Jongsma A, van Someren H, Westerfeld A, Hagemeijer A, Pearson P (1973) Localisation of genes on human chromosomes by studies of human chinese hamster somatic cell hybrids. Assignment of PGM₃ to chromosome 6 and regional mapping of PGD, PGM₁ and Pep-C genes on chromosome 1. Hum Genet 20: 195-202
110. Kaarsalo E, Melartin L, Blumberg BS (1967) Autosomal linkage between the albumin and Gc loci in humans. Science 158: 123-125
111. King RD, Khan HA, Foye JC, Greenberg JH, Jones HE (1975) Transferrin, iron and dermatophytes. I. Serum dermatophyte inhibitory component definitively identified as unsaturated transferrin. J Lab Clin Med 86: 204-212
112. Kirk RL, Cleve H, Bearn AG (1963) The distribution of the group specific component (Gc) in selected populations in South and South East Asia and Oceania. Acta genet (Basel) 13: 140-149
113. Klasan EC (1981) α_1 -antitrypsin phenotype and gene distribution in Southern Italy. Hum Hered 31: 180-182

114. Klasen EC, Bogaart AM, Bernini LF (1975) Chemical properties of α_1 -antitrypsin. In: Peeters H (ed) 22 nd Colloquim, protides of the biological fluids. Oxford: Pergamon pp. 511-514
115. Klasen EC, Franken C, Volkers WS, Bernini LF (1977) Population genetics of α_1 -antitrypsin in the Netherlands. Description of a new electrophoretic variant. Hum Genet 37: 303-313
116. Klasen EC, D'Andrea F, Bernini LF (1978) Phenotype and gene distribution of α_1 -antitrypsin in North Italian population. Hum Hered 28: 474-478
117. Koj A (1974) Acute-phase reactants. In: Allison AC (ed) Structure and function of plasma proteins. Vol 1, New York: Plenum Press pp. 73-125
118. Kühnl P, Spielmann W (1978) Investigations on the PGM₁^a polymorphism (phosphoglucumutase EC 2.7.5.1) by isoelectric focusing. Hum Genet 43: 57-67
119. Kühnl P, Spielmann W (1978 a) Transferrin: Evidence for two common subtypes of the Tf^C allele. Hum Genet 43: 91-95
120. Kühnl P, Spielmann W (1978 b) Subtypisierung der genetisch determinierten Serumproteinpolymorphismen des Transferrins (Tf), der gruppenspezifischen Komponente (Gc) und des α_1 -Antitrypsins (Pi). Archiv Genetik 51: 15-16
121. Kühnl P, Spielmann W (1979) A third common allele in the transferrin system, Tf^{C3}, detected by isoelectric focusing. Hum Genet 50: 193-198
122. Kühnl P, Spielmann W (1979 a) Transferrin: Evidence for a third common subtype of Tf^C (Tf^{C3}). Ref 8. Int Tagg d Ges für forens Blutgruppenkunde, London, Kongreßband: 503-505
123. Kühnl P, Tischberger H (1980) Amylase 1 polymorphism of human parotid saliva: Detection of a new allele, AMY₁⁵ by isoelectric focusing and AMY₁ population data from Germany. Z. Electrophoresis 1: 186-190

124. Kühnl P, Schmidtman U, Spielmann W (1977) Evidence for two additional alleles at the PGM_1 locus (phosphoglucomutase EC 2.7.5.1). Hum Genet 35: 219-223
125. Kühnl P, Schmidtman U, Spielmann W (1977a) Untersuchungen zum Polymorphismus der Phosphoglucomutase (PGM_1 EC 2.7.5.1) mittels isoelektrischer Fokussierung auf Polyacrylamidgel (PAGIF). Ref 7. Int Kongr der Ges für forens Blutgruppenkunde, Hamburg, Kongreßband: 243-252
126. Kühnl P, Spielmann W, Loa M (1978) An improved method for the identification of Gc^1 subtypes (group-specific component) by isoelectric focusing. Vox Sang 35: 401-404
127. Kühnl P, Spielmann W, Weber W (1979) Isoelectric focusing of rare transferrin (Tf) variants and common Tf^C subtypes. Hum Genet 46: 83-87
128. Kueppers F (1968) Genetically determined differences in the response of α_1 -antitrypsin levels in human serum to typhoid vaccine. Hum Genet 6: 207-214
129. Kueppers F (1971) α_1 -antitrypsin: physiology, genetics and pathology. Hum Genet 11: 177-189
130. Kueppers F (1972) α_1 -antitrypsin levels and electrophoretic patterns of several phenotypes. Hum Genet 15: 1-6
131. Kueppers F (1976) α_1 -Antitrypsin M_1 : A new common genetically determined variant. Am J Hum Genet 28: 370-377
132. Kueppers F, Bearn AG (1966) A possible experimental approach to the association of hereditary α_1 -antitrypsin deficiency and pulmonary emphysema. Proc Soc Exp Biol (N.Y) 121: 1207-1209
133. Kueppers F, Christopherson MJ (1978) α_1 -antitrypsin: further genetic heterogeneity revealed by isoelectric focusing. Am J Hum Genet 30: 359-365

134. Kueppers F, Fallat RJ (1969) Alpha₁-Antitrypsin deficiency: A defect in protein synthesis. Clin chim Acta 24: 401
135. Kueppers F, Briscoe WA, Bearn AG (1964) Hereditary deficiency of alpha₁-antitrypsin. Science 146: 1678-1679
136. Kueppers F, Brackertz D, Czygan PJ (1972) Serum alpha₁-antitrypsin levels during the ovarian cycle. Clin chim Acta 39: 131
137. Landsteiner K (1901) Über Agglutinationserscheinungen normaler menschlicher Blute. Wien. Klin Wschr 14: 1132
138. Laurell CB (1947) Studies on the transportation and metabolism of iron in the body. Acta physiol scand suppl 46
139. Laurell CB (1960) Metal-binding plasma protein and cation transport. In: Putnam FW (ed) The plasma proteins, Bd I, Acad Press, N.Y., 341
140. Laurell CB (1965) Antigen-antibody crossed electrophoresis. Anal Biochem 10: 358-361
141. Laurell CB, Eriksson S (1963) The electrophoretic alpha₁-globulin pattern of serum alpha₁-antitrypsin deficiency. Scand J clin Lab Invest 15: 132
142. Laurell CB, Persson U (1973) Analysis of plasma alpha₁-antitrypsin and their microheterogeneity. Biochim Biophys Acta, Amsterdam 310: 500-507
143. Laurell CB, Sveger T (1975) Mass screening of newborn Swedish infants for alpha₁-antitrypsin deficiency. Am J Hum Genet 27: 213-217
144. Laurell CB, Kullander S, Thorell J (1968) Effect of administration of a combined estrogen-progestin contraceptive on the level of individual plasma proteins. Scand J clin Lab Invest 21: 337
145. Lewontin RC (1967) An estimation of average heterozygosity in man. Am J Hum Genet 19: 681-685
146. Lieberman J, Mittman C, Kent JK (1971) Screening for heterozygous alpha₁-antitrypsin deficiency. III. A provocative test with diethylstilbestrol and effect of oral contraceptives. J med Ass 217: 1198

147. Lieberman J, Mittman C, Gordon HW (1972) α_1 -antitrypsin in the liver of patients with emphysema. *Science* 175: 63-65
148. Makino S, Reed C (1970) Distribution and elimination of exogenous α_1 -antitrypsin. *J Lab clin Med* 75: 742
149. Mancini G, Carbonara AO, Heremans JF (1965) Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry* 2: 235-254
150. Martin W (1979) Erfahrungen mit der isoelektrischen Fokussierung zur Darstellung von Isoenzym polymorphismen-PGM System. *Ärzt Lab* 25:44-46
151. Martin W (1979 a) Zur Gc- und Tf-Typisierung mit Hilfe der isoelektrischen Fokussierung. 8. Int Tagg der Ges für forens Blutgruppenkunde, London 1979, Kongreßband: 507-516
152. Martin W, Voß Ch (1977) Gc-Immunfixation auf Cellologel-Folien. *Ärzt Lab* 23: 337-338
153. Martin JP, Sesboue R, Charlionet R, Ropartz C, Pereira MT (1976) Genetic variants of serum α_1 -antitrypsin (Pit types) in Portuguese. *Hum Hered* 26: 310-314
154. Matsumoto H, Toyomasu T, Tamaki Y, Matsui K, Katayama K, Takei K, Tate K, Sato S, Imbe M, Shibata K (1979) The distribution of the phosphoglucosaminidase-1 (PGM₁) subtypes in Japanese. *Jpn J Leg Med*
155. Mayr WR (1977) Probleme bei der Anwendung des HLA-Systems im Vaterschaftsgutachten. 7. Int Tagg der Ges für forens Blutgruppenkunde, Hamburg 1977, Kongreßband: 417-441
156. Mc Alpine PJ, Hopkinson DA, Harris H (1970) The relative activities attributable to the three phosphoglucosaminidase loci (PGM₁, PGM₂, PGM₃). *Ann hum Genet* 34: 169-173
157. Mc Alpine PJ, Hopkinson DA, Harris H (1970 a) Molecular size estimates of the human phosphoglucosaminidases isozymes by gel filtration chromatography. *Ann hum Genet* 34: 177-185

180. Rittner Ch, Morath D, Klotz K, Allen FH (1969) Some population and family data on the inheritance of red cell phosphoglucomutase. *Hum Hered* 19: 674-677
181. Rittner Ch, Dewald G, Berghoff E, Mollenhauer E (1979) C6-Polymorphismus der sechsten Komplementkomponente. *Z. Rechtsmed* 83: 17-25
182. Roberts RC, Makey DG, Seal US (1966) Human transferrin. Molecular weight and sedimentation properties. *J Biol Chem* 241: 4907-4913
183. Robson ER, Sutherland I, Harris H (1966) Evidence for linkage between the transferrin locus (Tf) and the serum cholinesterase locus (E_1) in man. *Ann hum Genet* 29: 325-336
184. Rosseneu-Motreff MY, Soetewey F, Lamote R (1971) Size and shape determination of apotransferrin and transferrin monomers. *Biopolymers* 10: 1039-1048
185. Scheidegger JJ, Martin E, Rietton G (1956) L' apparition des diverses composantes antigeniques du serum au cours du developpement foetal. *Schweiz. med Wschr* 86: 224
186. Scherz R, Pflugshaupt R, Bütler R (1981) Isoelectric focusing of human red cell phosphoglucomutase (PGM₁). *Hum Hered* 31: 187-190
187. Schmitt MG jr, Phillips RB, Matzen RN, Rodey G (1975) α_1 -Antitrypsin deficiency: A study of the relationship between the Pi system and genetic markers. *Am J Hum Genet* 27: 315-321
188. Schönenberger M (1955) Streulichtmessungen an Plasmaproteinen. *Z. Naturforsch* 10b: 474-478
189. Schultze HE, Heremans JF (1966) Molecular biology of human serum proteins. Elsevier, Amsterdam-London-New York pp. 354
190. Schultze HE, Schwick G (1957) Immunchemischer Nachweis von Proteinveränderungen unter besonderer Berücksichtigung fermentativer Einwirkungen auf Glyko- und Lipoproteine. Immunelektrophoretische Studien. *Behringwerke Mitt* 33: 11

191. Schultze HE, Göllner I, Heide K, Schönberger M, Schwick G (1955) Zur Kenntnis der α -Globuline des menschlichen Normalserums. Z. Naturforsch 10 b: 463-473
192. Schultze HE, Heide K, Haupt H (1962) Alpha₁-Antitrypsin aus Humanserum. Klin Wschr 40: 427
193. Schwarzfischer F, Zieglmayer G (1963) Untersuchungen an Familien und Mutter-Kind-Paaren zum forensischen Beweiswert des Systems Gc. Med Klin 20: 845
194. Seger J, Salmon C (1971) Segregation atipique de la phosphoglucomutase (PGM₁) dans deux generations successives; impliquant l'existence de d'allele silencieux PGM₁ 0. Nouv Rev franc Hemat 11: 373
195. Sharp HL (1973) Alpha₁-antitrypsin deficiency. In: Mc Kusick VA, Clai-borne R (eds) Med Genet Hospital Practice Publishing Comp, New York pp. 131-140
196. Sharp HL, Freier EF (1972) Familial cirrhosis. In: Mittman C (ed) Acad Press, New york-London, 101
197. Sharp HL, Bridges RA, Krivit W, Freier EF (1969) Cirrhosis associated with α_1 -antitrypsin deficiency: A previously unrecognized inherited disorder. J Lab clin Med 73: 934-939
198. Sharp HL, Mathis R, Krivit W, Freier EF (1971) The liver in noncirrhotic alpha₁-antitrypsin deficiency (Abstr) J Lab clin Med 78: 1012
199. Smithies O (1955) Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum proteins of normal human adults. Biochem J 61: 629
200. Smithies O (1957) Variations in human β -globulins. Nature 180: 1482
201. Spencer N, Hopkinson DA, Harris H (1964) Phosphoglucomutase polymorphism in man. Nature 204: 742-745
202. Stålber H, Beckman G, Sikström C (1979) Subtypes of Transferrin C. Hum hered 29: 320-324

203. Sutton JG (1979) Characterization of isoenzymes of phosphoglucomutase (PGM) determined by the first (PGM_1) and second (PGM_2) locus observed by isoelectric focusing. *Hum Genet* 47: 279-290
204. Sutton JG, Burgess R (1978) Genetic evidence for four common alleles at the phosphoglucomutase 1 locus (PGM_1) detectable by isoelectric focusing. *Vox Sang* 34: 97-103
205. Svasti J, Bowman BH (1978) Human Group-specific component. Changes in electrophoretic mobility resulting from vitamin D binding and from neuraminidase digestion. *J Biochem Chem* 253: 4188-4194
206. Svensson M, Wetterling G (1979) Experience with isoelectric focusing in PGM_1 -subtyping. 8 th Int Congr Soc Forensic Haematogenetics, London 1979, Ref Bd: 557-561
207. Talamo RC, Allen JD, Kahan MG, Austen KF (1968) Hereditary α_1 -antitrypsin deficiency. *N Engl J Med* 278: 345
208. Talamo RC, Langley CE, Reed CE, Makino S (1973) α_1 -Antitrypsin deficiency: A variant with no detectable α_1 -antitrypsin. *Science* 181: 70-71
209. Thymann M (1978) Identification of a new serum protein polymorphism as transferrin. *Hum Genet* 43: 225-229
210. Thymann M (1979) Gc subtype determination by isoelectrofocusing in agarose gels. 8 th Int Congr Soc Forensic Haematogenetics, London 1979, Ref Bd: 437-448
211. Thymann M (1980) Agarose as supporting medium for analytical isoelectric focusing. Determination of the recently discovered subtypes in the human serum protein Gc. In: Radola BJ (ed) *Electrophoresis '79*, de Gruyter, Berlin-New York 1980: 123-128
212. Tiselius A (1937) A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixture. *Trans Faraday Soc* 33: 524

213. Turnbull A, Gbilet ER (1961) The binding and transport of iron by transferrin variants. J Lab clin Med 57: 450
214. Van den Broek WGM, Hoffmann JJML, Dijkman JH (1976) A new, high frequency variant of α_1 -antitrypsin. Hum Genet 34: 17-22
215. Vergnes H, Sevin J (1981) Isoelectric focusing of human phosphoglucomutase. Hum Hered 31: 156-160
216. Vogel F, Helmbold W (1972) Blutgruppen-Populationsgenetik und Statistik. In: Becker PE (Hrsg) Humangenetik I/4, Thieme Stuttgart
217. Walter H (1975) Transferrinsystem. In: Becker PE (Hrsg) Humangenetik I/3, Thieme Stuttgart pp. 137-166
218. Walter H, Strodtmann H, Hilling M, Sing IP, Bhasin MK, Veeraj P (1981) Transferrin subtypes in six Indian population samples. Hum Hered 31: 152-155
219. Wang AC, Sutton HE, Howard PN (1967) Human transferrins C and D Chi: an amino acid difference. Biochem Genet 1: 55
220. Weidinger S (1980) Alpha $_1$ -antitrypsin (α_1 -AT): Darstellung mittels Dünnschicht-Isoelektrofokussierung und Immunfixation. In: Radola BJ (ed) Elektrophorese Forum '80, TU München : 303-308
221. Weidinger S, Schwarzfischer F (1980) PGM $_1$ subtypes determined by agarose gel isoelectrofocusing. Z. Rechtsmed 84: 221-224
222. Weidinger S, Schwarzfischer F, Cleve H (1980) Classification of Transferrin (Tf) subtypes by isoelectrofocusing. Z. Rechtsmed 85: 255-261
223. Weidinger S, Schwarzfischer F, Cleve H (1980 a) Pi subtyping by isoelectric focusing: Further genetic studies and application to paternity examinations. Z. Rechtsmed 86: 1-7
224. Weidinger S, Cleve H, Schwarzfischer F, Patutschnick W (1981) The Gc-system in paternity examinations. Application of Gc subtyping by isoelectrofocusing. In: Hummel K, Gerchow J (eds) Biomathematical evidence of paternity. Springer Berlin-Heidelberg pp. 113-121

225. Weidinger S, Schwarzfischer F, Cleve H (1981 a) Genetische Untersuchungen zum Gt-Polymorphismus mittels der Agarosegel-Isoelektrofokussierung. 9 th Int Congr Soc Forensic Haemogenetics, Bern 1981, Kongreß - band (im Druck)
226. Weidinger S, Cleve H, Patutschnick W (1982) Evidence for a fourth Pi^{M} allele. Distribution of the Pi^{M} subtypes in Southern Germany. Z. Rechtsmed (im Druck)
227. Weitkamp LR (1978) Concerning the linkage relationship of the Gc and MNSs loci. Hum Genet 43: 215-220
228. Weitkamp LR, Rucknagel DL, Gershowitz H (1966) Genetic linkage between structural loci for albumin and group-specific component (Gc). Amer J hum Genet 18: 559-571
229. Welch SG, Swindlehurst CA, Mc Gregor IA, Williams K (1978) Isoelectric focusing of human red cell phosphoglucomutase. Hum Genet 43: 307-313
230. Wendt GG, Kirchberg G, Rube M, Ritter H (1971) Problematischer Mutter-Kind-Ausschluß mit PGM_1 . Hum Genet 11: 171-174
231. Yoshida A, Lieberman J, Guidulis L, Ewing C (1976) Molecular abnormality of human α_1 -antitrypsin variant (Pi^{ZZ}) associated with plasma activity deficiency. Proc Natl Acad Sci USA 73: 1324-1328

DANKSAGUNG

Am Ende dieser Arbeit möchte ich Herrn Prof. Dr. Dr. F. Schwarzfischer für die Überlassung des Untersuchungsmaterials, für sein stets entgegengebrachtes Wohlwollen, die Anteilnahme und Beratung während der Untersuchungen sehr herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. H. Cleve für die wertvollen Ratschläge und anregenden Diskussionen. Für die Unterstützung bei der Klassifizierung von Gc- und Pi-Varianten möchte ich mich ebenfalls bedanken.

Herrn Priv. Doz. Dr. P. Kühnl, Institut für Immunhämatologie der Universität Frankfurt, bin ich für die Bereitstellung von Referenzsera zu Dank verpflichtet.

Frau Patutschnick danke ich für die technische Unterstützung bei der Gc-Diagnostik.

Schließlich möchte ich Herrn Ruck für die photographischen Arbeiten recht herzlich danken.

LEBENS LAUF

29.03.1942	Geboren in Guttenburg, Krs. Mühldorf Obb., als Sohn des Landwirts Franz X. Weidinger und seiner Ehefrau Anna, geb. Ober
1948 - 1956	Volksschule in Guttenburg
1956 - 1959	Lehrzeit als Elektrohandwerker bei Elektromeister Peter Schels in Mühldorf. Besuch der Verbandsberufsschule Mühldorf
1959	Gesellenprüfung
1961 - 1964	Fernmeldehandwerker beim Fernmeldeamt Traunstein
1964 - 1971	Fernmeldetechniker in der Rundfunk- und Fernsehübertragungsstelle beim FA 1 München
1965 - 1967	Besuch der Münchner Volkshochschule
1966	Technische Fernmeldeassistentenprüfung
1967	Übernahme als Beamter in den Dienst der Deutschen Bundespost
1967 - 1970	Besuch von Oberstufenlehrgängen an der Städt. Abendrealschule München
1968	Ernennung zum Technischen Fernmeldeassistenten
1969	Verleihung der Eigenschaft eines Beamten auf Lebenszeit
1970	Ernennung zum Technischen Fernmeldesekretär
1971	Prüfung für die Zulassung zum Hochschulstudium ohne Reifezeugnis (Begabtenprüfung). Studienbeginn in den Fächern Biologie und Chemie an der Ludwig-Maximilians-Universität München
1974	Biologie-Diplomvorprüfung
1976	Biologie-Diplomhauptprüfung
1977	Staatsexamen für das höhere Lehramt (Biologie/Chemie) an der Ludwig-Maximilians-Universität München

- 1978 Verleihung des akademischen Grades eines Diplom-Biologen
- 1977 - 1982 Verwalter der Dienstgeschäfte eines wissenschaftlichen Assistenten am Institut für Anthropologie und Humangenetik der Universität München

München, den 6. April 1982

Sebastian Wieding

